

## Estudio del cariotipo en *Rhodophiala* aff. *advena* (Ker-Gawl.) Traub de la VIII Región de Chile

Carlos Baeza\*, Otto Schrader\*\* & Inelia Escobar\*

\* Departamento de Botánica, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

\*\* Federal Centre for Breeding Research on Cultivated Plants, Institute of Horticultural Crops, Neuer Weg 22/23, 06484 Quedlinburg, Germany.

### Resumen

Baeza, C., O. Schrader & I. Escobar. 2006. Estudio del cariotipo en *Rhodophiala* aff. *advena* (Ker-Gawl.) Traub de la VIII Región de Chile. *Kurtziana* 32 (1-2): 45-51.

Se realiza un estudio del cariotipo de *Rhodophiala* aff. *advena* (Ker-Gawl.) Traub en dos poblaciones colectadas en la VIII Región de Chile, mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con sondas de rDNA 5S y 18S/25S y tinción con DAPI. Se encuentra una dotación cromosómica  $2n = 2x = 18$ . Las poblaciones estudiadas no presentan diferencias significativas tanto en el índice de asimetría del cariotipo AsI % como en el índice de asimetría intracromosomal  $A_1$ . El complemento diploide de ambas poblaciones está constituido por 2 pares de cromosomas metacéntricos, 3 pares submetacéntricos y 4 pares subteloicéntricos. Las secuencias de genes de RNA ribosómico se localizan en 3 de los 9 pares de cromosomas. Los cromosomas 2 y 4 presentan un sitio de rDNA 5S en la porción terminal del brazo largo, mientras que el cromosoma 7 lleva un locus de rDNA 18S/25S en la porción subterminal del brazo, que corresponde a la región organizadora nucleolar (NOR). Se discuten los resultados con otros previos en el género.

**Palabras clave:** Amaryllidaceae, *Rhodophiala* aff. *advena*, Chile, cariotipo, rDNA 5S y 18S/25S, FISH.

### Abstract

Baeza, C., O. Schrader & I. Escobar. 2006. Karyotype of *Rhodophiala* aff. *advena* from the VIII Region of Chile. *Kurtziana* 32 (1-2): 45-51.

Double fluorescence *in situ* hybridization was used to examine the karyotype of two populations of *Rhodophiala* aff. *advena* (Ker-Gawl.) Traub from Chile, VIII Region, including the location of 5S and 18S/25S rDNA gene sequences with DAPI. The species is  $2n = 2x = 18$ . There are no significant differences between the chromosomal asymmetric index (AsI %) and intrachromosomal index ( $A_1$ ) among populations. The chromosome set contains 2 pairs of metacentric chromosomes, 3 pairs of submetacentric chromosomes and 4 pairs of subtelocentric chromosomes in both populations. Signal of 5S and 18S/25S rDNA were seen in 3 of the 9 chromosomes pairs. Chromosome 2 and 4 showed a signal of 5S rDNA in the terminal part of the long arm, whereas the chromosome 7 showed a 18S/25S rDNA signal in the subterminal portion of the long arm, corresponding to the nucleolar organizer region (NOR). The results are discussed with others previous in the genus.

**Key words:** Amaryllidaceae, *Rhodophiala* aff. *advena*, Chile, karyotype, rDNA 5S and 18S/25S, FISH.

## Introducción

*Rhodophiala* C. Presl (Amaryllidaceae) es un género con un número aproximado de 40 especies de Sudamérica tropical y subtropical. Su rango de distribución ocurre en Uruguay, Argentina, Bolivia y Chile (Naranjo & Poggio, 2000). *Rhodophiala* aff. *advena* (Ker-Gawl.) Traub es una especie endémica de Chile, que se distribuye preferentemente en la zona central de Chile. Presenta hojas lineares de hasta 30 cm de longitud, las flores se disponen en umbelas de 2-6 flores, con tépalos rojos o amarillos, de 4-6 cm de longitud.

Naranjo y Poggio (2000) realizan un análisis del cariotipo en 5 especies de *Rhodophiala* de Argentina, indicando para *R. bifida* (Herb.) Cabrera  $2n = 16$  y  $18$ , *R. elwessi* (C.H. Wright) Traub  $2n = 18, 36$  y  $72$ , *R. araucana* (Phil.) Traub  $2n = 54$ , en cambio, para *R. andicola* (Poepp.) Traub y *R. rhodolirion* (Baker) Traub  $2n = 16$ . Palma-Rojas (2000) señala para *Rhodophiala phycelloides* (Herb.) Hunz., *R. bagnoldii* (Herb.) Traub y *R. advena* (Ker-Gawl.) Traub de Chile un  $2n = 18$ , en cambio, para *R. laeta* Phil.  $2n = 16$ .

La utilidad de los datos citológicos ha sido ampliamente reconocida como una herramienta complementaria a estudios morfológicos y taxonómicos (Stebbins, 1971; Jones, 1970; Stuessy, 1990). Para la construcción de mapas físicos de cromosomas y para estudios filogenéticos resulta fundamental el conocimiento de la posición y número de localizaciones de los genes multicopias de rDNA (Schrader et al., 1997; Schwarzach & Heslop-Harrison, 2000). La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) ha sido utilizada como una técnica que ayuda a resolver problemas taxonómicos en diversos grupos de plantas (Zhang & Sang, 1998; Adams et al., 2000; Weiss-Schneeweiss et al., 2003). Es también una herramienta muy utilizada para estudios citogenéticos moleculares (Schrader et al., 2000, 2002). Los genes de RNA ribosómico 5S y 18S/25S son los marcadores citogenéticos moleculares más comúnmente utilizados, puesto que son abundantes y su estructura es muy conservativa en todas las Angiospermas (Schmidt & Heslop-Harrison, 1998).

En este estudio se determina el cariotipo de *Rhodophiala* aff. *advena* y se examina la ubicación de las secuencias de rDNA 5S y 18S/25S en sus cromosomas usando FISH.

## Materiales y Métodos

Material vegetal:

Se recolectaron semillas y bulbos de *Rhodophiala* aff. *advena* en dos localidades de la VIII Región: CHILE: **Provincia de Concepción**. Camino de San Pedro de La Paz a Coronel, sector Stadio Italiano, 30 m.s.m., 36°54'S-73°08'W, 20-XII-2002, C. Baeza 4182 b.- **Provincia de Ñuble**. Colmuyao, 2 kms al norte, 5 m.s.m., 36°13'S-72°48'W, 28-XI-2000, C. Baeza, P. López & M. Parra 2054. El material de referencia está depositado en el Herbario de la Universidad de Concepción (CONC).

*Realización de preparaciones cromosómicas y análisis cariotípico*

La metodología utilizada es la propuesta por Baeza & Schrader (2003, 2004). Puntas de raíces de 1-2 cm de longitud, obtenidas a partir de plántulas o de bulbos en invernadero, fueron pretratadas con una solución 2mM de 8-hidroxiquinoleína por 24 horas a 4°C. Posteriormente, se fijaron en etanol / ácido acético (3:1) por 24 horas y almacenadas en alcohol 70% a -20 °C. Previo a la maceración, las raíces fueron lavadas 3 veces en agua destilada por 30 minutos, para luego ser digeridas en una mezcla de enzimas de 4% celulasa "Onozuka R-10" (Serva) y 1% pectilasa Y-23 (Seishin Pharmaceutical) en 75 mM de KCl, a pH 4,0 por 40 minutos a 37 °C. Luego de un breve lavado en agua destilada, las raíces fueron mantenidas durante un minuto en ácido acético al 45% y luego se hizo el aplastado correspondiente. Los cubreobjetos fueron removidos después de mantener las muestras a -84 °C. Los preparados se dejaron secar durante 1-2 días a temperatura ambiente y almacenados a -20 °C. Los cromosomas fueron teñidos con una solución 1,0 ng/l de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Todos los cromosomas fueron medidos después de la hibridación *in situ* fluorescente. Las placas metafásicas

se fotografiaron en un microscopio Zeiss Axioskop. Los cromosomas se midieron con la ayuda del programa "MicroMeasure 3.3" (Reeves, 2001) y se clasificaron de acuerdo a la razón entre los brazos ( $r$  = brazo largo / brazo corto; según Levan et al., 1964), designados por la posición del centrómero: 1,0-1,7 (metacéntrico; m), 1,7-3,0 (submetacéntrico; sm), 3,0-7,0 (subtelocéntrico; st) y 7,0-∞ (telocéntrico; t). Para las poblaciones analizadas (10 placas metafásicas de cada una) se determinó el índice de asimetría del cariotipo ASI % usando la fórmula descrita por Arano y Saito (1980) y el índice de asimetría intracromosomal  $A_1$  descrito por Romero Zarco (1986). Para una mejor comparación, la longitud de cada cromosoma se calculó como un porcentaje del largo genómico total del complemento diploide. Se usaron los programas Corel Draw versión 8.0 para la representación gráfica del complemento cromosómico (idiograma) y Paint Shop Pro 7 para procesar las fotomicrografías.

#### Preparación de las sondas de DNA e hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

La sonda de rDNA 5S (117 bp) fue amplificada y simultáneamente marcada con digoxigenina-11-dUTP (Roche) a partir del DNA genómico de *Allium ampeloprasum* L. via PCR usando cebadores específicos para dichos genes (Gottlob-McHugh et al., 1990).

La sonda de rDNA 18/25S (220 bp, denominada VER 17 por Yakura & Tanifuji, 1983 y gentilmente suministrada por el Profesor S. Tanifuji) fue marcada con biotina-16-dUTP mediante "nick translation" de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Roche). El procedimiento de FISH fue desarrollado de acuerdo a Schrader et al. (2000) con pequeñas modificaciones. El lavado riguroso se realizó en una

solución 0,3 % de 2xSSC a 42°C. Para la doble hibridación *in situ* fluorescente se utilizó una mezcla de hibridación que contenía por preparado 80 ng de cada sonda de DNA y 10 µg de espermio de salmón en 20 µl de buffer de hibridación (50% formamida, 10% sulfato de dextrano, 2xSSC). La biotina fue detectada con 6 ng/µl de streptavidina-Cy3 (Dianova) y la digoxigenina con 6 ng/µl de anti-digoxigenina-FITC (Roche Diagnostics). Después del lavado de los preparados (tres veces en 4xSSC con 0,1 % Tween 20 a 42°C) las señales FITC fueron realzadas con 6 ng/µl de suero anti-oveja-fluoresceína (Dianova). Los cromosomas fueron coloreados con 1,0 ng/µl de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Molecular Probes) durante 5 minutos a 23°C. Las fotografías fueron tomadas usando una cámara CCD digital (Visitron Systems) con analizador de imágenes. La pseudocoloración y combinación de imágenes se realizó con el software *ad hoc* de la cámara.

## Resultados y Discusión

Las dos poblaciones de *Rhodophiala aff. advena* estudiadas presentan un cariotipo asimétrico con  $2n = 2x = 18$  (Figs. 1 y 2), con dos pares de cromosomas metacéntricos, que son los más pequeños del complemento, tres pares submetacéntricos y 4 pares subtelocéntricos. La razón del par más largo dividido por el par más corto (R) es de 2,59 para la población Baeza 4182 b y de 2,51 para la población Baeza et al. 2054. El índice de asimetría del cariotipo ASI % es de 73,6 para la población Baeza 4182 b y de 73,5 para la población Baeza et al. 2054, mientras que el de asimetría intracromosómica  $A_1$  es de 0,96 para las dos poblaciones estudiadas (Tabla 1). Los resulta-

TABLA 1

Características del cariotipo de las poblaciones de *Rhodophiala aff. advena* estudiadas. ASI % = índice de asimetría de Arano y Saito (1980),  $A_1$  = índice de asimetría intracromosómico, R = razón del par más largo / par más corto, LCH (µm) = longitud del complemento haploide ( $\pm$  desviación estándar)

Población	2n	Fórmula cariotípica	ASI %	$A_1$	R	LCH
Baeza 2054	18	2m + 3sm + 4st	73,5	0,96	2,51	191,11 $\pm$ 5,91
Baeza 4182 b	18	2m + 3sm + 4st	73,6	0,96	2,59	192,70 $\pm$ 6,35

TABLA 2

Mediciones cromosómicas e índice braquial ( $r$ ) de *Rhodophiala* aff. *advena* (Baeza 2054, 4182 b). Se detallan las longitudes promedio como porcentaje de la longitud del genoma haploide de 20 metafases ( $197,01 \pm 21,41 \mu\text{m}$ ). La posición de los sitios de rDNA 5S y 18S/25S son indicados mediante uno o dos asteriscos, respectivamente.

Par cromosómico	Long. brazo largo (%) $\pm$ S.D.	Long. brazo corto (%) $\pm$ S.D.	Long. total relativa (%)	Long. total absoluta ( $\mu\text{m}$ )	$r$	Tipo de cromosoma
1	5,48 $\pm$ 0,35	1,56 $\pm$ 0,24	7,04	13,87	3,51	st
2	*4,79 $\pm$ 0,35	2,01 $\pm$ 0,35	6,80	13,40	2,38	sm
3	4,89 $\pm$ 0,17	1,67 $\pm$ 0,00	6,56	12,92	2,93	sm
4	*4,85 $\pm$ 0,22	1,42 $\pm$ 0,36	6,27	12,35	3,42	st
5	4,72 $\pm$ 0,10	1,37 $\pm$ 0,14	6,09	12,00	3,45	st
6	4,40 $\pm$ 0,42	1,27 $\pm$ 0,22	5,67	11,17	3,47	st
7	**3,72 $\pm$ 0,17	1,69 $\pm$ 0,00	5,41	10,66	2,20	sm
8	1,85 $\pm$ 0,17	1,43 $\pm$ 0,10	3,28	6,46	1,29	m
9	1,72 $\pm$ 0,14	1,29 $\pm$ 0,10	3,01	5,93	1,33	m

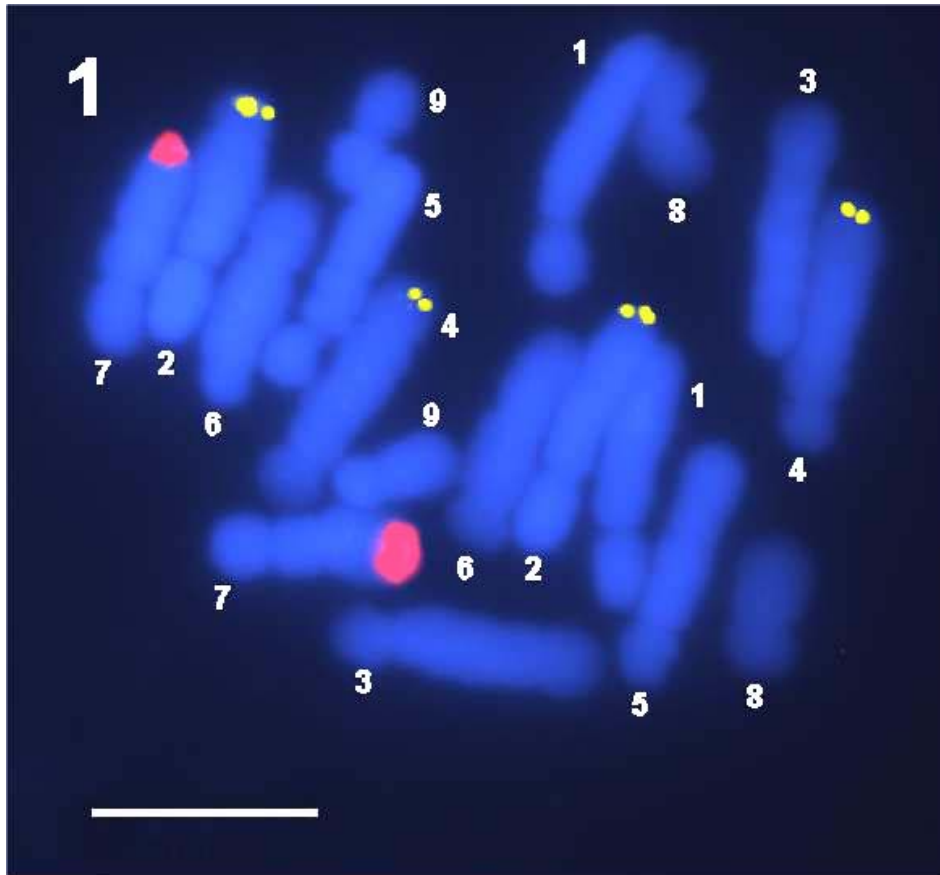


Fig. 1.- Cromosomas somáticos de *Rhodophiala* aff. *advena* (Baeza 4182 b) coloreados con DAPI (azul) luego de la hibridación *in situ* fluorescente con sondas de genes de rRNA específicos para 5S (amarillo) y 18S/25S (rojo). Escala = 10  $\mu\text{m}$ .

dos de las medidas de los cromosomas son resumidas en la Tabla 2. Todos estos datos corroboran que las dos accesiones pertenecen a la misma entidad taxonómica.

El cariotipo de *Rhodophiala* aff. *advena* (Ker-Gawl.) Traub es muy similar al cariotipo de *Rhodophiala elwesii* (C.H. Wright) Traub, especie que crece en Argentina (Naranjo & Poggio, 2000), que posee también  $2n = 18$  cromosomas. Estos autores señalan además la presencia de la región organizadora nucleolar (NOR) en el brazo largo del cromosoma submetacéntrico de tamaño medio del cariotipo, situación similar a lo encontrado en *Rhodophiala* aff. *advena* (Fig. 2). Es interesante indicar que Palma-Rojas (2000) trabajó con *Rhodophiala phycelloides* (Herb.) Hunz., *R. bagnoldii* (Herb.) Traub y *R. advena* (Ker-Gawl.) Traub contando  $2n = 18$  cromosomas para estas especies, con un cariotipo formado por 2 pares de cromosomas metacéntricos, 1 par submetacéntrico y 6 pares subtelocéntricos, indicando además, que el cromosoma 7 presenta en el brazo largo una constricción secundaria subtelomérica que corresponde a la NOR. Esta situación es idéntica a lo encontrado en *Rhodophiala* aff. *advena* puesto que la región

organizadora del nucléolo también se ubica en el brazo largo del cromosoma 7 (Figs. 1 y 2). Es probable que la presencia de la NOR en el cromosoma 7 sea una característica propia del género *Rhodophiala*. Palma-Rojas (l.c.) indica, además, la presencia de cromosomas B en las tres especies de *Rhodophiala* analizadas. En *R. aff. advena* no se observó la presencia de este tipo de cromosomas.

Con respecto al mapeo citogenético de los genes de rDNA, sólo los cromosomas 2, 4 y 7 presentan sitios de hibridación con las sondas utilizadas (Figs. 1 y 2). Las señales de los genes de rDNA 5S y 18S/25S se localizan en 3 de los 9 pares cromosómicos. Los cromosomas 2 y 4 presentan una señal de 5S rDNA en la porción terminal del brazo largo. Por otro lado, el cromosoma 7 presenta en la porción terminal del brazo largo una señal de rDNA 18S/25S. (Figs. 1 y 2). Se encontró que los sitios de rDNA 5S son más numerosos que los de 18S/25S, lo cual ya había sido señalado por otros autores en otros géneros de Angiospermas (Hemleben & Werts, 1988; Sastri et al., 1992; Moscone et al., 1999). Respecto a la intensidad de las señales de FISH, se observó una gran similitud entre los homólogos, lo que estaría

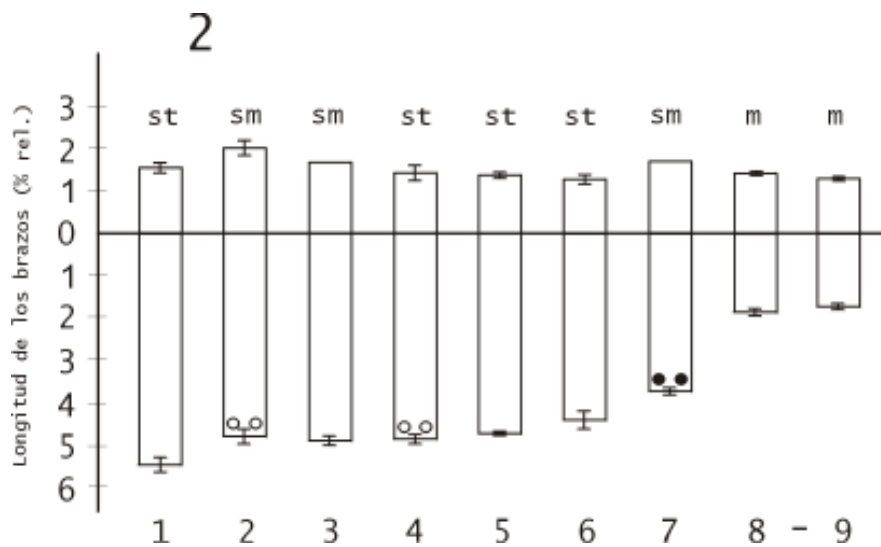


Fig. 2.- Idiograma del complemento cromosómico haploide de *Rhodophiala* aff. *advena* (Baeza 2054, 4182 b). Los cromosomas se han ordenado de acuerdo a su tamaño decreciente. Locus de rDNA 18S/25S, círculos en negro; locus de rDNA 5S, círculos en blanco. (Las desviaciones estándar se indican como barras en los brazos de cada cromosoma).

indicando que no habría entre ellos diferencias en el número de copias de genes (Appels et al., 1980; Weiss-Schneeweiss et al., 2003).

Estudios citogenéticos en Amaryllidaceae chilenas podrían constituir una herramienta muy adecuada para solucionar problemas taxonómicos, puesto que esta familia presenta grandes problemas taxonómicos sobre todo en la delimitación de sus géneros. La falta de material de herbario o la inaccesibilidad a él han sido los principales contratiempos para clarificar la taxonomía del grupo. Baeza & Schrader (2003) describen el cariotipo de *Placea amoena* indicando  $2n = 16$ , lo que se corresponde con los datos de Naranjo (1985), el cual encontró el mismo número cromosómico en *Placea arzae* Phil. Sería interesante en el futuro analizar citogenéticamente la totalidad de los géneros de Amaryllidaceae chilenas, con el fin de aportar información que permita esclarecer la posición taxonómica de los representantes de esta familia en Chile.

### Agradecimientos

El primer autor agradece a la Fundación Alexander von Humboldt por la beca de especialización otorgada (Georg Foster Stipendium) para realizar un postdoctorado en Citogenética Vegetal en Quedlinburg, Alemania, al Departamento de Botánica de la Universidad de Concepción por todas las facilidades otorgadas y al Proyecto Fundación Andes N° C-14055.

### Referencias bibliográficas

- Adams, S., I. Leitch, M. Bennett, M. Chase & A. Leitch. 2000. Ribosomal DNA evolution and phylogeny in *Aloe* (Asphodelaceae). *Amer. J. Bot.* 87: 1578-1583.
- Appels, R., W. Gerlach, E. Dennis, H. Swift & W. Peacock. 1980. Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals. *Chromosoma* 78: 293-311.
- Arano, H. & H. Saito. 1980. Cytological studies in family Umbelliferae 5. Karyotypes of seven species in subtribe Seselinae. *La Kromosomo* 2: 471-480.
- Baeza, M. & O. Schrader. 2003. Karyotype analysis of *Placea amoena* Phil. (Amaryllidaceae) by double fluorescence in situ hybridization. *Caryologia* 57: 200-205.
- & —— . 2004. Comparative karyotype analysis in *Haplopappus* Cass. and *Grindelia* Willd. (Asteraceae) by double FISH with rRNA specific genes. *Plant Syst. Evol.* 251: 161-172.
- Gottlob-McHugh S., M. Levesque, K. MacKenzie, M. Olson, O. Yarosh & D. Johnson. 1990. Organization of the 5S rRNA genes in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill and conservation of the 5S rRNA repeat structure in higher plants. *Genome* 33: 486-494.
- Hemleben, V. & D. Werts. 1988. Sequence organization and putative regulatory elements in the 5S rRNA genes of two higher plants (*Vigna radiata* and *Matthiola incana*). *Gene* 62: 165-169.
- Jones, K. 1970. Chromosome changes in plant evolution. *Taxon* 19: 172-179.
- Levan, A., K. Fredga & A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Mosccone, E., F. Klein, M. Lambrou, J. Fuchs & D. Schweizer. 1999. Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). *Genome* 42: 1224-1233.
- Naranjo, C. 1985. El cariotipo de *Placea arzae* (Amaryllidaceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 24: 197-199.
- & L. Poggio. 2000. Karyotypes of five *Rhodophiala* species (Amaryllidaceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 35 (3-4): 335-343.
- Palma-Rojas, C. 2000. Caracterización citogenética de los géneros *Rhodophiala* Presl. y *Phycella* Lindl. (Amaryllidaceae), en Peñailillo, P. & Schiappacasse, F. (eds). *Los geófitos nativos y su importancia en la floricultura*, pp. 73-79. Fundación para la Innovación Agraria (FIA) y Dirección de Investigación, Universidad de Talca (DIUT), Chile.
- Reeves, A. 2001. MicroMeasure: a new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. *Genome* 44: 239-443.
- Romero Zarco, C. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 35: 526-530.
- Sastri, D., K. Hilu, R. Appels, E. Lagudah, J. Playford & B. Baum. 1992. An overview of evolution in plant 5S DNA. *Plant Syst. Evol.* 183: 169-181.
- Schmidt, T. & J. Heslop-Harrison. 1998. Genomes, genes and junk: the large-scale organization of

- plant chromosomes. *Trends Plant Sci.* 3: 195-199.
- Schrader, O., R. Ahne, J. Fuchs & I. Schubert. 1997. Karyotype analysis of *Helianthus annuus* using Giemsa banding and fluorescence *in situ* hybridization. *Chrom. Res.* 5: 451-456.
- Schrader, O., H. Budahn & R. Ahne. 2000. Detection of 5S and 25S rRNA genes in *Sinapis alba*, *Raphanus sativus* and *Brassica napus* by double fluorescence *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 100: 665-669.
- Schrader, O., R. Ahne, H. Zhao, H. Budahn & H. Peterka. 2002. Hohe Karyotypvariabilität in somatischen Nachkommenschaften von zwei *Allium*-Bastarden. *Vortr. Pflanzenzüchtung* 54: 381-384.
- Schwarzacher, T. & P. Heslop-Harrison. 2000. *Practical in situ hybridization*. BIOS Scientific Publishers Ltd, The Bath Press, Bath, Oxford.
- Stebbins, G. 1971. *Chromosomal evolution in higher plants*. Addison-Wesley, London.
- Stuessy, T. 1990. *Plant taxonomy. The systematics evaluation of comparative data*. Columbia University Press, New York.
- Weiss-Schneeweiss, H., T. Stuessy, S. Siljak-Yakovlev, C. Baeza & J. Parker. 2003. Systematic and evolutionary implications of karyotypes of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae) from South America. *Plant Syst. Evol.* 241: 171-184.
- Yakura, K. & S. Tanifuji. 1983. Molecular cloning and restriction analysis of Eco RI-fragments of *Vicia faba* rDNA. *Plant Cell Physiol.* 24: 1327-1330.
- Zhang, D. & T. Sang. 1998. Chromosomal structural rearrangement of *Paeonia brownii* and *P. californica* revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Genome* 41: 848-853.

*Original recibido el 3 de marzo de 2005;  
aceptado el 3 de febrero de 2006.*