

Relaciones filogenéticas de *Rhodolirium montanum* Phil. y especies afines, basadas en secuencias nucleotídicas de la región ITS y análisis cariotípico

Phylogenetic relationships of *Rhodolirium montanum* Phil. and related species based on nucleotide sequences from ITS region and karyotype analysis

MANUEL MUÑOZ^{1,2}, RICARDO RIEGEL¹, PETER SEEMANN¹, PATRICIO PEÑAILILLO³, FLAVIA SCHIAPPACASSE⁴ & JOSÉ NÚÑEZ⁵

¹Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

²Escuela de Graduados, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

³Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca, 2 Norte 685, Talca, Chile.

⁴Departamento de Horticultura, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, 2 Norte 685, Talca, Chile.

⁵Instituto de Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

manuelmun@gmail.com

RESUMEN

La taxonomía de los géneros chilenos de Amaryllidaceae es confusa, persistiendo problemas taxonómicos tanto a nivel de géneros como de especies. Actualmente existe controversia acerca de la correcta clasificación de especies hasta ahora asignadas a *Rhodophiala* C.Presl. A través del estudio de aspectos morfológicos, recientemente se ha sugerido la rehabilitación del género *Rhodolirium* Phil., donde *Rhodolirium montanum* Phil. es considerada como especie tipo. Esta especie ha sido denominada *Rhodophiala rhodolirion* (Baker) Traub en las clasificaciones tradicionales. Dado que los datos morfológicos han provisto información limitada y ambigua en la clasificación de las Amarilidáceas chilenas, este trabajo evalúa la pertinencia de formalizar la rehabilitación del género *Rhodolirium* y en particular de la especie *Rhodolirium montanum*, a través de un análisis de morfología cromosómica y de secuencias nucleotídicas de la región ITS de seis especies nativas de Amaryllidaceae. Los datos moleculares indican que las especies *Rhodophiala bagnoldii*, *R. montana*, *R. splendens*, *R. phycelloides* y *R. ananuca* forman un grupo monofilético más emparentado con *Hippeastrum* Herb. que con *Rhodolirium*, género que se presenta como grupo hermano de *Phycella* en el análisis filogenético. La separación de *Rhodolirium* con respecto de *Rhodophiala* está respaldada por diferencias en número y morfología cromosómica, presentando el primero un número cromosómico de $2n = 16$ y un índice de asimetría intracromosómica (Isc) de 0,46; mientras que el segundo posee $2n = 18$ e Isc de 0,59-0,62. De esta manera, los resultados de los estudios cromosómicos y moleculares, junto a diferencias en exomorfología, tales como forma del estigma, perigonio y paraperigonio, apoyan la validez del género *Rhodolirium* Phil. y por ende de la especie *Rhodolirium montanum* Phil.

PALABRAS CLAVE: *Rhodophiala*, *Rhodolirium montanum*, Amaryllidaceae, ITS, cariotipo.

ABSTRACT

The taxonomy of Chilean Amaryllidaceae is confusing. Taxonomic problems still persist at the level of genera and species. Currently there is controversy about the correct classification of species so far assigned to *Rhodophiala* C.Presl. Through the study of morphological characters, recently has been suggested the rehabilitation of the genus *Rhodolirium* Phil., where the species *Rhodolirium montanum* Phil. is considered as type species. This species was named *Rhodophiala rhodolirion* (Baker) Traub in traditional classifications. Since morphological data have provided limited and ambiguous information in the classification of Amaryllidaceae in Chile, this paper assesses the relevance of formalize the rehabilitation of genus *Rhodolirium* and particularly the resurrection of the species *R. montanum*, through an analysis of chromosomal morphology and nucleotide sequences of the ITS region of six native species of Amaryllidaceae. The molecular data indicate that the species *Rhodophiala bagnoldii*, *R. montana*, *R. splendens*, *R. phycelloides* and *R. ananuca* form a monophyletic group more closely related to *Hippeastrum* than *Rhodolirium*. This genus is presented as closely related to *Phycella* in the phylogenetic analysis using ITS sequences. This separation of *Rhodolirium* with respect *Rhodophiala* is supported by differences in chromosome number and morphology, presenting the first, chromosome number of $2n = 16$ and intrachromosomal asymmetry index (Isc) of 0.46, while the latter has $2n = 18$ and Isc of 0.59 to 0.62. Thus,

chromosomal and molecular results together differences in exomorphology already mentioned by other authors support the rehabilitation of the genus *Rhodolirium* Phil. and the resurrection of the species *Rhodolirium montanum* Phil.

KEYWORDS: *Rhodophiala*, *Rhodolirium montanum*, Amaryllidaceae, ITS, karyotype.

INTRODUCCIÓN

La familia Amaryllidaceae comprende aproximadamente 60 géneros y alrededor de 850 especies distribuidas principalmente en las zonas cálidas, cuyos centros de diversificación se encuentran en Sudamérica, Sudáfrica y la región mediterránea de Europa (Meerow & Snijman 1998, Meerow *et al.* 2000a, Strydom 2005). Esta familia de geófitas bulbosas se destaca por sus numerosos géneros cultivados como ornamentales, entre los que se encuentran *Amaryllis* L., *Crinum* L., *Galanthus* L., *Leucojum* L., *Lycoris* Herb. y *Narcissus* L. (Simpson 2006). Los géneros *Placea* Miers y *Phycella* Lindl., endémicos de Chile y el género nativo *Rhodophiala* C.Presl, presentan vistosas flores, por lo que han llamado la atención de los investigadores en floricultura dado su potencial ornamental (Schiappacasse *et al.* 2002, Olate & Bridgen 2005). No obstante lo anterior, entre los problemas taxonómicos más controvertidos de la familia está la falta de consenso en las clasificaciones tribales y en las delimitaciones genéricas (Meerow *et al.* 1999, 2000a, 2000b) debido principalmente a la compleja variación morfológica de géneros tales como *Hippeastrum* Herb., *Phycella* y *Rhodophiala* (Arroyo & Cutler 1984).

En Chile, la taxonomía de Amaryllidaceae no ha estado exenta de confusiones y aun persisten problemas taxonómicos tanto a nivel de géneros como de especies (Ravenna 2003). Ejemplo de lo anterior es que, por muchos años, las especies de Amaryllidaceae de corola vistosa e infundibuliforme y con estigma capitado o trifidos fueron consideradas tanto dentro del género *Hippeastrum* como de *Rhodophiala* (Marticorena & Quezada 1985). Basándose principalmente en caracteres morfológicos, Ravenna (2003) propone una nueva clasificación para los géneros chilenos de la familia Amaryllidaceae, citando 11 géneros y alrededor de 35 especies. Sin embargo, la simple delimitación morfológica de los géneros de la familia es difícil de establecer por la compleja variabilidad de los caracteres utilizados hasta ahora (Baeza *et al.* 2009).

Baeza & Schrader (2004) y Baeza *et al.* (2006, 2007a, 2007b, 2009) indican la importancia de los estudios cariológicos para clarificar la posición taxonómica de los géneros de Amaryllidaceae chilenos. Anteriormente, otros investigadores ya habían señalado la significancia del

número y forma de los cromosomas en la clasificación genérica de esta familia (Naranjo & Andrada 1975, Naranjo & Poggio 2000, Meerow *et al.* 2000a, Palma-Rojas 2000).

El género *Rhodolirium* descrito por Philippi (1858), por muchos años estuvo inmerso en géneros, tales como *Hippeastrum* y *Rhodophiala*. Naranjo & Poggio (2000) propusieron la rehabilitación del género *Rhodolirium* sobre la base del número y morfología de los cromosomas. Ravenna (2003) acepta este género utilizando el nombre *Rhodolirion*, no existiendo una explicación clara para este cambio de nombre. Sin embargo, éste es un nombre utilizado por Baker (1878) cuando denominó las especies descritas por Philippi como sinónimos de *Hippeastrum*. También, Baker renombró a *R. andinum* como *Hippeastrum rhodolirion*. Posteriormente, en 1888, el mismo autor empleó *Rhodolirion* como un subgénero de *Hippeastrum*, considerando erradamente *R. andinum* como el tipo.

Desde el punto de vista morfológico, *Rhodolirium* incluye plantas uni- a plurifloras, de perigonio infundibuliforme y tubo alargado, el paraperigonio, si está presente, es formado por lacinias o escamas libres, y el estigma es capitado. Este género comprende a cinco especies, las cuales se distribuyen desde el norte de Chile, en zonas de vegetación de neblina costera, hasta la provincia de Osorno por el sur, y desde el cinturón costero hasta el lado oriental de los Andes, en Argentina, a alturas entre 150-2500 m s.n.m. (Ravenna 2003).

Bajo los nuevos paradigmas de la taxonomía integrativa (Dayrat 2005), los datos morfológicos deben ser sometidos al filtro de otras aproximaciones y tipos de datos diferentes, entre ellos, la información a nivel molecular. Una de las regiones del genoma cuya variación es una valiosa fuente de caracteres informativos para la inferencia filogenética en Angiospermas, es la región del espaciador interno transcrito (ITS) del ADN ribosomal nuclear 18S-26S (Baldwin *et al.* 1995). Meerow *et al.* (2000b), utilizando datos provenientes del análisis de la región ITS del cistrón ribosomal nuclear 18S-5,8S-26S, distinguen a *Rhodophiala* de *Hippeastrum* y sostienen que *Rhodophiala* tendría un origen aparentemente polifilético. Además, el género *Phycella* aparecía como el grupo hermano a éstos y otros géneros americanos.

Puesto que el estudio de la región ITS ha resultado

resolutivo en la delimitación de grupos filogenéticamente más consistentes dentro de los géneros americanos de la familia Amaryllidaceae, los objetivos del presente estudio son determinar las relaciones de parentesco de cinco especies chilenas del género *Rhodophiala* y una única especie del género *Rhodolirium*, con respecto a otras especies de géneros afines cuyas secuencias ITS ya han sido publicadas e integrar a esta hipótesis de relaciones la información citológica de las especies y las evidencias provenientes de la exomorfología.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Rhodophiala bagnoldii (Herb.) Traub y *R. phycelloides* (Herb.) Hunz. fueron recolectadas en Huasco, costa de la Región de Atacama; *R. ananuca* (Phil.) Traub en Aguada de Tongoy, costa de la Región de Atacama; *R. montana* (Phil.) Traub en Laguna del Maule, en la cordillera de la Región del Maule, *R. splendens* (Rengifo) Traub en Vilches Alto, cordillera de la Región del Maule y *Rhodolirium montanum* en Los Queñes, cordillera de la Región del Maule. Los ejemplares herborizados de cada una de estas especies fueron depositados en el herbario de la Universidad de Talca con los números 3357, 2407, 3358, 2269, 3015 y 2679, respectivamente. Además, se mantienen en cultivo bulbos de las especies mencionadas bajo invernadero frío en la Estación Experimental de Panguilemo de la misma institución. El material fue identificado utilizando las claves de identificación propuestas por Traub & Moldenke (1949) y Traub (1956) y posteriormente comparado con las descripciones originales.

Los caracteres morfológicos utilizados para confeccionar la Tabla II se observaron en ejemplares frescos y especímenes herborizados, además de consultar la literatura respectiva, Muñoz y Moreira (2000) y Ravenna (2003).

ANÁLISIS CROMOSÓMICOS

Para las especies mencionadas de *Rhodophiala*, a excepción de *R. phycelloides*, se realizaron preparaciones citológicas a partir de ápices radicales según el protocolo descrito por Grant *et al.* (1984) y adaptado por Muñoz *et al.* (2006).

Se tomaron cinco placas metafásicas provenientes de 2 a 4 plantas para cada especie. Se contabilizó el número cromosómico somático y para cada cromosoma se midió la longitud del brazo largo (BL) y del brazo corto (BC). Los cromosomas se agruparon en pares de acuerdo a su similitud y se ordenaron de mayor a menor tamaño. Con estas mediciones se calculó el índice centromérico (BC/LT x 100), fórmula cariotípica básica (Levan *et al.* 1964) y el índice de asimetría cariotípica (A1, intracromosómica) según la fórmula propuesta por Romero Zarco (1986).

ANÁLISIS MOLECULARES

La extracción de ADN se realizó a partir de 0.1 g de hojas jóvenes que fueron maceradas en 500 µL de buffer de extracción CTAB 2% (Tris 100 mM pH 8, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, CTAB 2%) y 2 µL de mercaptoetanol. Se incubó durante 30 minutos a 60°C y luego se adicionó 500 µL de cloroformo:fenol:alcohol isoamílico (25:24:1) seguido de centrifugado (5 min a 10.000 rpm). Después de la adición de 200 µL de isopropanol frío (-18°C) al sobrenadante, se centrifugó nuevamente (10 min a 11.000 rpm), se lavó el precipitado con etanol frío 70% y se resuspendió en agua deionizada estéril.

La región ITS fue amplificada utilizando los partidores ITS1-Plant-F, (5'-CGCGAGAAGTCCACTG-3') e ITS C26A-R (5'-GTTTCTTTTCTCCGCT-3') (Varghese *et al.* 2003). La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 50 µL, consistente de 35,2 µL de agua deionizada estéril, 5µL de buffer 10X (Fermentas), 1,25 µL de dNTPs (2 mM; Invitrogen), 3 µL de MgCl₂ (25 Mm; Fermentas), 1 µL de cada partidador (10 pmol/µL) y 0,1 µL de *Taq* polimerasa (5U/µL) (Fermentas). Las amplificaciones se realizaron utilizando el siguiente perfil térmico: denaturación inicial a 94 °C por 3 min., para luego realizar 39 ciclos de 94 °C por 30 seg., reasociación a 50 °C por 1 min. y extensión a 72 °C por 1 min. Se finalizó con una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% mediante tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/mL).

Todos los productos amplificados fueron purificados y secuenciados por ambos extremos (Macrogen Inc., Seoul, Corea). El alineamiento de las secuencias se hizo con el programa MAFFT 5.0 (Katoh *et al.* 2005) bajo métodos de refinamiento iterativos, incorporando la información del alineamiento más seguro tanto local (L-INS-i y EINS-i) como global (G-INS-i). Se usaron los parámetros por defecto involucrados en cada algoritmo. Las secuencias fueron depositadas en Genbank con los siguientes números de acceso para cada especie: *Rhodophiala montana* (Genbank, FN436271), *R. splendens* (FN436273), *R. bagnoldii* (FN436270), *R. phycelloides* (FN436272), *R. ananuca* (FN386450) y *Rhodolirium montanum* (FN436274).

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

LOS ANÁLISIS DE MÁXIMA VEROSIMILITUD (ML) SE REALIZARON CON GARLI 0.951 (ZWICKL 2006). LA ELECCIÓN DEL MODELO DE MEJOR AJUSTE FUE BASADO EN EL CRITERIO DE AKAIKE, AIC (POSADA & BUCKLEY 2004), USANDO EL PROGRAMA JMODELTEST (POSADA 2008). LOS ANÁLISIS FUERON FINALIZADOS DESPUÉS DE 10000 SIN UN MEJORAMIENTO DE LA TOPOLOGÍA DEL ÁRBOL. PARA ASEGURAR CONVERGENCIA SE REALIZARON DOS ANÁLISIS DE ML. LOS SOPRIES DE CADA NODO FUERON EVALUADOS USANDO 200 ITERACIONES POR BOOTSTRAP (FELSENSTEIN 1985), CON CADA ITERACIÓN TERMINADA DESPUÉS DE 5000 GENERACIONES SIN

un mejoramiento significativo de la topología. Se realizó también un análisis Bayesiano usando MrBayes 3.0b4 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). Al igual que en el análisis de ML, la elección del modelo basado en AIC se hizo con jModelTest (Posada 2008). Las cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) fueron corridas por 7×10^6 generaciones. Los árboles se muestrearon cada cien generaciones. La longitud de las ramas de los árboles fueron salvadas y el 25% del “burn-in” descartado después de graficar el logaritmo de los valores de verosimilitud de los árboles muestreados contra el número de generaciones.

En la construcción de los filogramas se utilizó como grupo externo *Amaryllis belladonna* L. y *A. paradisicola* Snijman, cuyas secuencias ITS se encuentran en la base de datos Genbank con números de acceso AF373084 y AF373073, respectivamente. Además, se agregaron las secuencias de *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub (AF223477) *R. chilensis* (L’Hér.) Traub (AF223480), *Phycella ignea* (Lindl.) Lindl. (AF223505) y de *Hippeastrum brasilianum* (Traub & J.L.Doran) Dutilh (AF223479), *H. macbridei* (Vargas) Gereá & Brako (AF223509), *H. mollevilquense* (Cárdenas) Van Scheepen (AF223477), e *H. parodii* Hunz. & A.A.Cocucci (AF223508).

RESULTADOS

ANÁLISIS CROMOSÓMICOS, FÓRMULA CARIOTÍPICA E ÍNDICES DE ASIMETRÍA

De las seis especies en estudio, cinco mostraron número cromosómico somático de $2n=18$; sólo *Rhodolirium montanum* difiere de las demás y presenta $2n=16$ (Fig. 1). Los índices de asimetría de los cariotipos tienden a acercarse a 0,6 en la mayoría de las especies, diferenciándose aquél de *R. montanum*, que es de 0,46. En cuatro especies, los dos pares de cromosomas más pequeños son metacéntricos, los de mayor tamaño son submetacéntricos y subtelocéntricos (Fig. 1 A, B, C), en *R. montanum* los 2 pares más pequeños son subtelocéntricos y metacéntricos, los de mayor tamaño son metacéntricos, submetacéntricos y subtelocéntricos (Fig. 1D y Tabla I).

ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE LA REGIÓN ITS

El filograma de la Figura 2 representa las relaciones filogenéticas entre las especies analizadas en este estudio. Es posible observar dos clados con buen soporte de bootstrap (BS=100) y de probabilidad *a posteriori* (PP=1.0). En el clado inferior se forman dos subclados

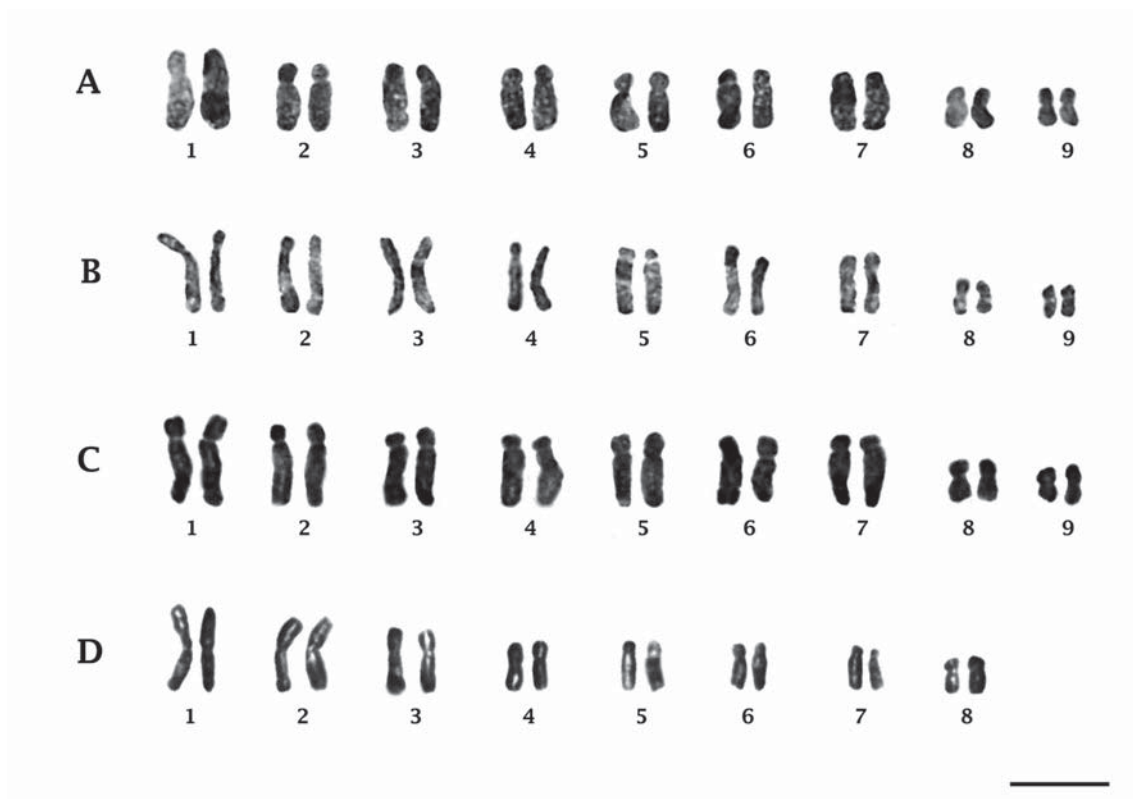


FIGURA 1. Cariotipos: A. *Rhodophiala bagnoldii*, B. *Rhodophiala montana*, C. *Rhodophiala splendens*, D. *Rhodolirium montanum*. Barra = 10 μ m.

FIGURE 1. Karyotypes: A. *Rhodophiala bagnoldii*, B. *Rhodophiala montana*, C. *Rhodophiala splendens*, D. *Rhodolirium montanum*. Bar = 10 μ m.

con buenos soportes (BS=100 y PP= 1.0). Un subclado incluye a todas las especies del género *Hippeastrum* cuyo número cromosómico diploide es 22 y el otro subclado a las especies pertenecientes al género *Rhodophiala* con un 2n=18.

En el clado superior se ubican dos subclados con buen

apoyo (BS=100 y PP=1.0), separándose el género *Phycella* de *Rhodolirium*. *Rhodolirium montanum* difiere en 15,5% de sus bases con respecto a las especies de *Rhodophiala* (640 sitios alineados). Esto se ve respaldado por diferencias tanto en su cariotología (2n=16) como en su morfología (Tabla II) con respecto al género *Rhodophiala*.

TABLA I. Caracterización morfológica de los cromosomas de distintas especies de *Rhodophiala* y *Rhodolirium montanum* (= *Rhodophiala rhodolirion*).

TABLE I. Characterization of chromosomal morphology of different species of *Rhodophiala* and *Rhodolirium montanum* (= *Rhodophiala rhodolirion*).

ESPECIE	2n	PLOIDÍA	FÓRMULA CARIOTÍPICA*	ÍNDICE DE ASIMETRÍA INTRACROMOSÓMICA
<i>R. montana</i>	18	2X	<10%: 4m >10%: 6sm + 8st	0,59
<i>R. splendens</i>	18	2X	< 10%: 4m >10%: 8sm + 6 st	0,62
<i>R. bagnoldii</i>	18	2X	<10%: 2m >10%: 8sm + 6st	0,60
<i>R. ananuca</i>	18	2X	<10%: 4m >10%: 6sm + 8st	0,61
<i>R. montanum</i>	16	2X	<10%: 2st + 2sm >10%: 6m + 4sm + 2st	0,46

*El complemento haploide se dividió en dos grupos de cromosomas: cromosomas pequeños, que individualmente representan menos del 10% del complemento haploide y cromosomas grandes, que individualmente representan más del 10%. Cromosomas metacéntricos (m), submetacéntricos (sm) y subtelocéntricos (st). / The haploid complement was divided into two groups of chromosomes: chromosomes small, that individually represent less than 10% of the haploid chromosome complement and large, that individually represent more than 10%. Metacentric (m), submetacentric (sm) and subtelocentric (st).

TABLA II. Caracteres morfológicos de los géneros *Rhodolirium*, *Phycella*, *Rhodophiala*, *Placea* y *Traubia*.

TABLE II. Morphological characters for *Rhodolirium*, *Phycella*, *Rhodophiala*, *Placea* and *Traubia*.

GÉNEROS	FORMA DEL PERIGONIO	FORMA DEL ESTIGMA	PARAPERIGONIO
<i>Rhodolirium</i>	Infundibuliforme	Capitado-trilobado	Si presente formado por apéndices escamosos libres
<i>Phycella</i>	Tubuloso	Capitado	Si presente formado por apéndices fimbriados libres
<i>Rhodophiala</i>	Infundibuliforme	Trífido	Si presente formado por apéndices fimbriados libres
<i>Placea</i>	Infundibuliforme	Trilobado	Presente formado por apéndices unidos en la base o en toda su longitud (corona)
<i>Traubia</i>	Estrellado	Capitado punteado	Ausente

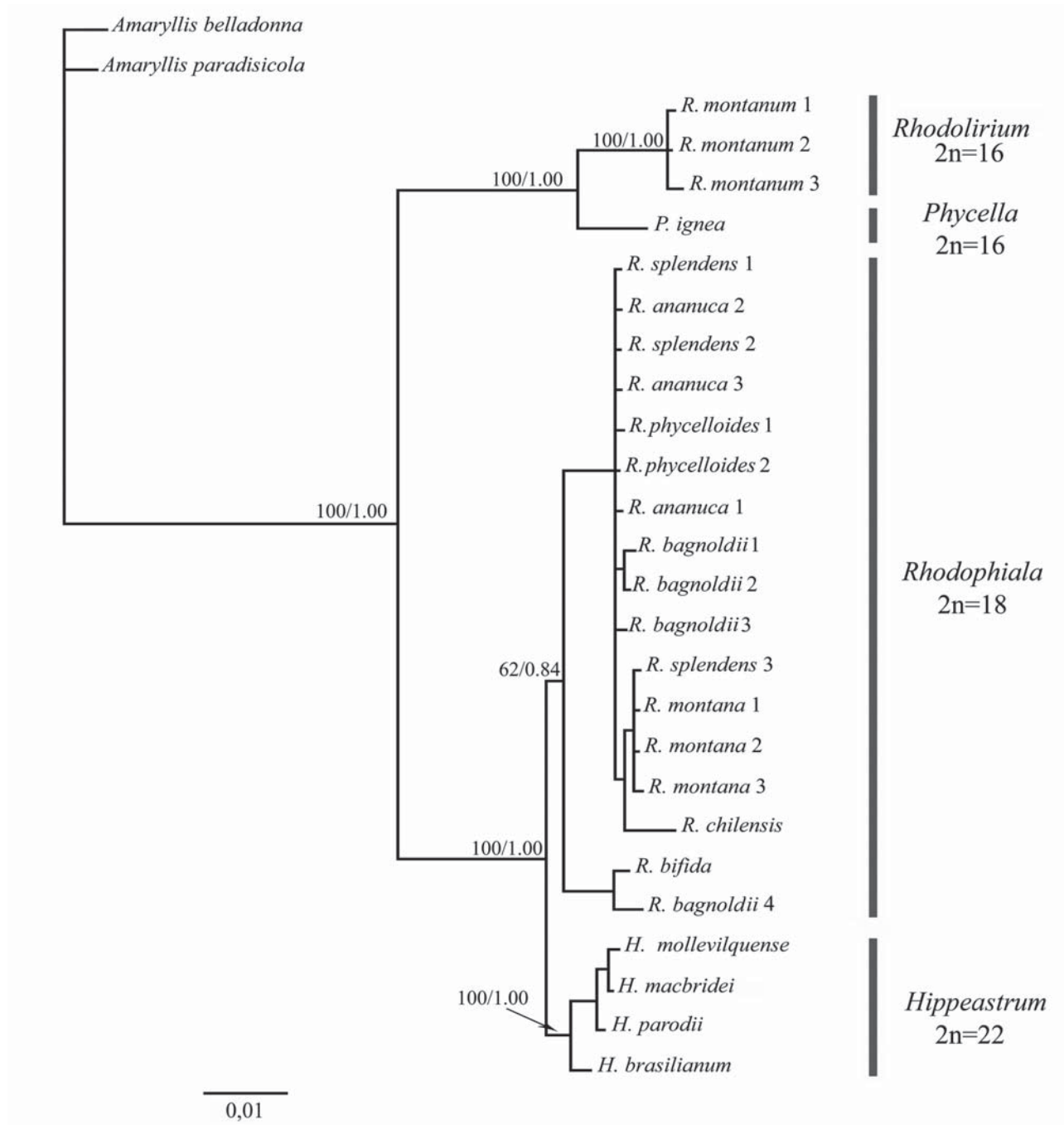


FIGURA 2. Árbol filogenético obtenido a partir de la región ITS de especies seleccionadas de *Rhodolirium*, *Rhodophiala*, *Hippeastrum* y *Phycella*. Cada taxa terminal corresponde a un individuo. Los valores sobre los nodos indican soporte de bootstrap (BS) y probabilidad *a posteriori* (PP), respectivamente.

FIGURE 2. Phylogenetic tree of ITS region of selected species of *Rhodolirium*, *Rhodophiala*, *Hippeastrum* and *Phycella*. Each terminal taxa is an individual. Values above each node indicate bootstrap support (BS) and *a posteriori* probability (PP), respectively.

DISCUSIÓN

Los resultados en cuanto a número y morfología cromosómica (Fig. 1) y topología del árbol filogenético (Fig. 2) son consistentes en las delimitaciones genéricas de *Rhodolirium*, *Rhodophiala*, *Phycella* e *Hippeastrum*.

Rhodophiala e *Hippeastrum* aparecen como grupos monofiléticos más emparentados entre sí que con respecto a los otros géneros analizados. Esto explicaría la inclusión de *Rhodophiala* en *Hippeastrum* en tratamientos taxonómicos clásicos (Baker 1878, Marticorena & Quezada 1985). Meerow *et al.* (2000b) separaron estos géneros utilizando datos de la región ITS, lo cual es corroborado en el presente trabajo con las nuevas especies analizadas. Además esta separación está sustentada por diferencias en el número cromosómico, que en *Hippeastrum* es $2n = 22$ y en *Rhodophiala* $2n = 18$.

El otro grupo filogenéticamente emparentado lo constituyen *Phycella* y *Rhodolirium*, compartiendo igual número cromosómico ($2n = 16$), sin embargo los datos moleculares son robustos en separar ambas entidades (Fig 2). Además, las especies de *Phycella* se distinguen morfológicamente de *Rhodolirium* por su perigonio recto, tubular o estrechamente campanulado, caracteres diagnósticos del género (Ravenna 2003). Los análisis realizados en este trabajo confirman la separación del género *Rhodolirium* de *Rhodophiala*. Además de las diferencias moleculares y en el número cromosómico diploide, existen marcadas variaciones en la morfología cromosómica entre ambos géneros. La diferencia más notable entre *Rhodophiala* y *Rhodolirium* radica en que, en este último, los 2 pares de cromosomas de mayor tamaño corresponden a cromosomas metacéntricos (Fig. 1), característica observada en *R. montanum* (este trabajo), *Rhodolirium speciosum* (Herb.) Ravenna y *Rhodolirium andicola* (Poepp.) Ravenna (Baeza *et al.* 2009). Esta característica no se encuentra en los cariotipos de las especies de *Rhodophiala* descritos en este estudio ni en los descritos por Naranjo & Poggio (2000) para *R. bifida*, *R. elwesii* y *R. araucana*.

Otra diferencia importante entre *Rhodolirium* y *Rhodophiala* se aprecia en el índice de asimetría cromosómica. Los índices de asimetría intracromosómica de *Rhodophiala montana*, *R. splendens*, *R. bagnoldii* y *R. ananuca* bordean los 0,6, diferenciándose de *Rhodolirium montanum*, cuyo índice de asimetría es de 0,46 que refleja una distinta morfología cromosómica. Romero Zarco (1986) indica que este índice es una buena forma de expresar la morfología cariotípica general en plantas. Naranjo & Poggio (2000) determinaron índices de asimetría intracromosómica (A1) de 0,55 a 0,66 para *Rhodophiala bifida*, *R. elwesii* y *R. araucana*, diferenciándose claramente de *R. montanum* (= *Rhodophiala rhodolirion*) y *Rhodolirium andicola* (= *Rhodophiala andicola*) cuyos índices de asimetría fueron 0,36 y 0,23 respectivamente. Aunque el número cromosómico mayoritariamente reportado para *Rhodophiala* es de $2n = 18$ (Palma-Rojas 2000, Baeza

et al. 2006). Naranjo & Poggio (2000) encontraron especies con dos citotipos, tal como ocurría para *R. bifida* ($2n=16$ y $2n=18$), y especies poliploides como sucede con *R. elwesii* ($n= 18, 36, 72$). Estos citotipos no se encontraron en las especies estudiadas.

Con los datos obtenidos por este estudio se da soporte cromosómico y molecular para la separación de *Rhodolirium* de *Rhodophiala*, evidencia que apoya el tratamiento taxonómico basado principalmente en datos morfológicos propuesto por Ravenna (2003), para estos géneros y en donde la especie *Rhodolirium montanum* corresponde al tipo del género.

En especial la inferencia filogenética realizada en base a datos moleculares de la región ITS respalda a *Rhodolirium* como género válido. Por otra parte, la separación en el filograma de los distintos géneros analizados en grupos altamente soportados, confirma la utilidad de la información provista por la región ITS en las delimitaciones genéricas en Amaryllidaceae americanas, tal como anteriormente lo reportara Meerow *et al.* (2000b).

En síntesis, *Rhodolirium* es un género endémico de Chile y Argentina compuesto por la especie tipo del género *R. montanum* y las especies *Rhodolirium andicola*, *R. chilense*, *R. fulgens*, *R. laetum* y *R. speciosum* (Ravenna 2003). La principal diferencia morfológica entre los géneros *Rhodolirium* y *Rhodophiala* (género tratado como *Myostemma* Salisb. por Ravenna *l.c.*), es el grado de división del estigma, que en *Rhodolirium* es siempre capitado, en cambio en *Rhodophiala* es trifido (Baeza *et al.* 2009), el tubo del perigonio alargado (Philippi 1858) y un paraperigonio formado por escamas conspicuas, en muchas de sus especies. Cariológicamente las especies estudiadas del género *Rhodolirium* (*R. andicola*, *R. laetum*, *R. montanum* y *R. speciosum*) (Naranjo & Poggio 2000; Palma-Rojas 2000, Baeza *et al.* 2009) presentan un número cromosómico $2n=16$, número compartido por otros géneros endémicos de Chile de la familia Amaryllidaceae: *Placea* Miers, *Phycella* Lindl. y *Traubia* Moldenke (Flory 1968, Palma-Rojas 2000, Baeza & Schrader 2004, Baeza *et al.* 2007a, 2009b), aunque la fórmula haploide es muy distinta (Baeza *et al.* 2009a), como también su morfología (Tabla II).

Sin duda, futuros estudios que combinen la morfología del cariotipo, los datos moleculares (ITS u otros) y la variación de los rasgos morfológicos de los géneros de Amaryllidaceae presentes en Chile dilucidarán la compleja taxonomía a nivel genérico de este grupo de plantas chilenas con potencial ornamental.

La correcta denominación de las entidades es necesaria para mejorar nuestro conocimiento de la biodiversidad (Valdecasas *et al.* 2008). El inadecuado tratamiento taxonómico de estos taxones refleja la falta de conocimiento de la biodiversidad de la familia Amarilidácea chilena, con el riesgo de que entidades diferentes y, probablemente, con potencialidades y atributos disímiles, permanezcan ocultas en taxones débilmente justificados.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento aportado por el proyecto FIA N° BIOT-01-A-071 y al Dr. Marcelo Baeza (Universidad de Concepción) por el apoyo bibliográfico y comentarios.

BIBLIOGRAFÍA

- ARROYO, S. C. & D. F. CUTLER. 1984. Evolutionary and taxonomic aspects of the internal morphology in Amaryllidaceae from South America and South Africa. *Kew Bulletin* 39: 467-498.
- BAEZA, C.M. & O. SCHRADER. 2004. Karyotype analysis of *Placea amoena* Phil. (Amaryllidaceae) by double fluorescence in situ hybridization. *Caryologia* 57: 200-205.
- BAEZA, C.M., 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.
- BAEZA, C.M., E. RUIZ & M. NEGRITTO. 2007a. El número cromosómico de *Phycella australis* Ravenna (Amaryllidaceae). *Gayana Botánica* 64(1): 119-122.
- BAEZA, C.M., O. SCHRADER, A. TERRAB, T. STUESSY, M. ROSAS, E. RUIZ, M. NEGRITTO & E. URTUBEY. 2007b. Recuentos cromosómicos en plantas que crecen en Chile. III. *Gayana Botánica* 64(2): 175-183.
- BAEZA, C.M., C. MARIANGEL, E. RUIZ & M. NEGRITTO. 2009. El cariotipo fundamental en *Rhodolirium speciosum* (Herb.) Ravenna y *R. andicola* (Poepp.) Ravenna (Amaryllidaceae). *Gayana Botánica* 66(1): 99-102.
- BAKER, J.G. 1878. An enumeration and classification of the species of *Hippeastrum*. *Journal of Botany* 16: 79-85.
- BALDWIN, B., M. SANDERSON, M. PORTER, M. WOJCIECHOWSKI, C. M. CAMPBELL & M. DONOGHUE. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82(2): 247-277.
- DAYRAT, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407-415.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- FLORY, W.S. 1968. Chromosome diversity in species, and in hybrids, of tribe Zephyrantheae. *The Nucleus* (Suppl.) 1868: 79-95.
- KATO, K., K. KUMA, H. TOH & T. MIYATA. 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* 33: 511-518.
- GRANT, J., A. BROWN & J. GRACE. 1984. Cytological and isozyme diversity in *Glycine tomentella* Hayata (Leguminosae). *Australian Journal of Botany* 32: 665-667.
- LEVAN, A., K. FREDGA & A. SANDBERG. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- MARTICORENA, C. & M. QUEZADA. 1985. Catálogo de la flora vascular de Chile. *Gayana Botánica* 42: 1-157.
- MEEROW, A.W. & D.A. SNIJMAN. 1998. Amaryllidaceae, In: K. Kubitzki (ed.). *The families and genera of vascular plants III. Flowering plants. Monocotyledons. Lilianae (except Orchidaceae)*, pp. 83-110. Springer. Berlin.
- MEEROW, A., M. FAY, C. GUY, Q.-B. LI, F. ZAMAN & M. CHASE. 1999. Systematics of Amaryllidaceae based on cladistic analysis of plastid *rbcL*, and *trnL-F* sequence data. *American Journal of Botany* 86: 1325-1345.
- MEEROW, A., M. FAY, M. CHASE, C. GUY, Q.-B. LI, D. SNIJMAN & S. L. YANG. 2000a. Phylogeny of Amaryllidaceae: molecules and morphology, en K.L. Wilson y D.A. Morrison (eds.). *Monocots: Systematics and Evolution*. pp. 372-386. CSIRO. Melbourne.
- MEEROW, A., C. GUY, Q.-B. LI & S.L. YANG. 2000b. Phylogeny of the American Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. *Systematic Botany* 25: 708-726.
- MUÑOZ, M. & A. MOREIRA. 2000. Géneros Endémicos Monocotiledóneas, Chile www.chlorischile.cl
- MUÑOZ, M., R. RIEGEL & P. SEEMANN. 2006. Use of image cytometry for the early screening of induced autopolyploids. *Plant Breeding* 125: 414-416.
- NARANJO, C.A. & B. ANDRADA. 1975. El cariotipo fundamental del género *Hippeastrum* Herb. (Amaryllidaceae) *Darwiniana* 19: 556-582.
- NARANJO, C. & L. POGGIO. 2000. Karyotypes of five *Rhodophiala* species (Amaryllidaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 35(3-4): 335-343.
- OLATE, E. & M. BRIDGEN. 2005. Techniques for the *in vitro* propagation of *Rhodophiala* and *Leucocoryne* spp. *Acta Horticulturae* 673: 335-339.
- PALMA-ROJAS, C. 2000. Caracterización citogenética de los géneros *Rhodophiala* C.Presl y *Phycella* Lindl. (Amaryllidaceae). En: F. Schiappacasse & P. Peñailillo (eds.), *Los geófitos nativos y su importancia en la floricultura*. Universidad de Talca. Chile. pp. 73-79.
- PHILIPPI, R.A. 1858. *Plantarum novarum chilensium*. Centuria quinta. *Linnaea* 29: 65-66.
- POSADA, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- POSADA, D. & T.R. BUCKLEY. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of the AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology* 53: 793-808.
- RAVENNA, P. 2003. Elucidation and systematics of the Chilean genera of Amaryllidaceae. *Botanica Australis* 2: 1-20.
- ROMERO ZARCO, C. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 35: 526-530.
- RONQUIST, F. & J.P. HUELSENBECK. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- SCHIAPPACASSE, F., P. PEÑAILILLO & P. YÁNEZ. 2002. Propagación de bulbosas chilenas ornamentales. Editorial Universidad de Talca. Talca. Chile. 65 pp.
- SIMPSON, M.G. 2006. *Plant Systematics. Amaryllidaceae*. Elsevier Academic Press. Canada. pp. 169-171.
- STRYDOM, A. 2005. Phylogenetic relationships in the family Amaryllidaceae. Thesis. Degree Ph.D., Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Department of Plant Sciences, Genetics, University of the Free State. p. i-x + 559 <http://etd.uovs.ac.za/ETD-db/theses/available/etd-09122006-103922/unrestricted/StrydomA.pdf> (accesada: 30 de noviembre de 2008).
- TRAUB, H. 1956. The genera *Rhodophiala* C.Presl and *Phycella* Lindl.: key to the species and synonymy. *Herbertia* 12: 67-76.

- TRAUB, H. & H. MOLDENKE. 1949. Amaryllidaceae: Tribe Amaryllieae. The American Plant Life Society. Stanford. California. 194 pp.
- VALDECASAS, A., D. WILLIAMS & Q. WHELLER. 2008. 'Integrative taxonomy' then and now: a response to Dayrat (2005). *Biological Journal of the Linnean Society*, 93: 211-216.
- VARGHESE, R., V. CHAUHAN & A. MISRA. 2003. Hypervariable spacer regions are good sites for developing specific PCR-RFLP markers and PCR primers for screening actinorhizal symbionts. *Journal of Bioscience* 28: 437-442.
- ZWICKL, D. J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin. 115 pp.

Recibido: 20.05.10
Aceptado: 18.10.10