



## ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

## Variabilidad genética y morfológica y estructuración poblacional en *Alstroemeria hookeri* subsp. *hookeri* (Alstroemeriaceae), endémica de Chile

Genetic and morphological variation and population structure in *Alstroemeria hookeri* subsp. *hookeri* (Alstroemeriaceae), endemic to Chile

EDUARDO RUIZ<sup>1</sup>\*, KAREN BALBOA<sup>1</sup>, MARÍA A. NEGRITTO<sup>1</sup>, CARLOS M. BAEZA<sup>1</sup>, GLENDA FUENTES<sup>1</sup> & VERÓNICA BRICEÑO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile

\*Autor correspondiente: erui@udec.cl

### RESUMEN

El género *Alstroemeria* es exclusivamente sudamericano y consta de 82 taxa distribuyéndose, principalmente en Chile y Brasil. La gran importancia económica que han adquirido las *Alstroemerias* chilenas como plantas ornamentales ha despertado gran interés en la variabilidad morfológica de las flores y variabilidad genética en especies con potencial valor económico. Una de ellas es *Alstroemeria hookeri* que posee cuatro subespecies, de las cuales, la subespecie tipo, es endémica de las regiones del Maule y Biobío. Su distribución geográfica consiste de dos rangos, separados por la Cordillera de la Costa. Así, existen poblaciones costeras, creciendo entre los 5-20 m de altura en las provincias de Arauco, Concepción, Ñuble y Cauquenes y poblaciones del interior creciendo entre los 100-150 m de altura, en las provincias de Biobío y Ñuble. Evidencias preliminares señalan diferencias fenotípicas entre poblaciones costeras y del interior, relacionadas con el color y forma de los tépalos. Por esta razón, se realizó un estudio morfológico comparativo en el rango completo de distribución de esta subespecie y estudiar su genética poblacional, especialmente los niveles de estructuración poblacional. Se analizaron 33 caracteres florales, mediante métodos de ordenación. El estudio morfológico indica una tendencia a separar las poblaciones en dos grupos, coincidiendo con los extremos de la variación morfológica y con ambos rangos de distribución, existiendo caracteres que aportan a ello. Los índices de variabilidad genética fueron determinados usando 17 loci aloenzimáticos. Además, se estimaron los valores de estructuración poblacional y se realizó un análisis de AMOVA. Se estimaron valores de distancia genética de Nei, entre todos los pares de poblaciones para construir un dendrograma que refleje las relaciones de similitud genética. Los resultados indican altos valores de estructuración entre poblaciones y baja variabilidad genética intrapoblacional en esta subespecie. Los resultados del AMOVA indican que la variabilidad se da principalmente entre poblaciones. Sin embargo, estos resultados variaron cuando se analizan las poblaciones de ambos rangos de distribución separadamente. La similitud genética no coincide con la divergencia morfológica entre individuos de la costa e interior, indicando que algunas poblaciones del interior están más relacionadas genéticamente, con poblaciones costeras que con aquellas de su mismo rango geográfico.

**Palabras clave:** *Alstroemeria hookeri*, divergencia genética, genética poblacional, variabilidad morfológica.

### ABSTRACT

The genus *Alstroemeria* consists of 82, exclusively South American taxa that are distributed mainly in Chile and Brazil. The great economic relevance, that has acquired the Chilean *Alstroemeria* species, as ornamentals, has aroused great interest in the morphological variability of their flowers and genetic variability in those species with potential economic value. One of these species is *Alstroemeria hookeri* which has four subspecies, of which *A. hookeri* subsp. *hookeri*, is endemic to the Maule and Biobío Regions. Its geographic distribution consists of two ranges, separated by the Coastal Mountain. Thus, there are populations growing in the coastal range, between 5-20 m high, in the provinces of Arauco, Concepcion, Ñuble, and Cauquenes, and populations of the Central Valley, growing between 100-150 m in the Biobío and Ñuble provinces. Preliminary evidence indicated phenotypic differences between coastal and Central Valley populations, principally in colour and shape of the tepals. For this reason, a comparative morphological study was carried out in the complete geographic distribution of this subspecies and a population genetics study was conducted also, especially to determine the levels of population structure. Thirty three floral characters were analyzed through ordination methods. The morphological study shows a slight tendency to separate the populations into two groups, which coincide with the extremes of morphological variation and both geographic ranges, with characters that contribute to this separation. The genetic variability indices were estimated using 17 allozymic loci. We estimated population structure and also carried out an AMOVA analysis. Nei's genetic distances among all population pairs were estimated to obtain a dendrogram showing the genetic similarity relationships. The results indicate high levels of genetic structure and low values of

within population genetic diversity were found. The results of AMOVA indicate that the variability occurs mainly among populations. However, these results varied when populations from both geographic ranges were separately analyzed. The genetic similarities are not congruent with the morphological divergence between both geographic ranges, indicating that some populations from Central Valley are more related genetically to some from coastal populations than populations from their own geographic range.

**Key words:** *Alstroemeria hookeri*, genetic divergence, morphological variability, population genetics.

## INTRODUCCIÓN

*Alstroemeria* L. (Alstroemeriaceae) es un género exclusivamente sudamericano y comprende 82 taxa distribuidos desde Venezuela a Argentina y Chile. La mayor cantidad de especies se encuentra en Chile central y este de Brasil (Bayer 1987, Muñoz & Moreira 2003). Las especies de este género crecen desde el nivel del mar hasta los 4500 m de altitud (Aagesen & Sanso 2003; Ravenna 1988, Sanso 2002). En Chile existen 49 taxa (33 especies, 8 variedades y 8 subespecies), de los cuales 40 son endémicos y 42 están en la zona central del país (28°-38° S), solo tres especies se distribuyen al norte de los 28° S y cuatro al sur de los 38° S (Muñoz & Moreira 2003). El alto nivel de endemismo que presenta el género en esta zona geográfica podría deberse a la gran diversidad de ambientes que ofrece la zona central del país (Arroyo et al. 2008, Lazo et al. 2008).

Dada la belleza de sus flores, las especies de *Alstroemeria* han adquirido relevancia mundial como plantas ornamentales de cultivo y de corte (Buitendijk & Ramanna 1996, Buitendijk et al. 1997) alcanzando un alto valor comercial (Stephens et al. 1993). Holanda, Inglaterra, Japón y Estados Unidos presentan programas de cultivo y propagación de especies con fines comerciales (Miyake 1989, Jeu et al. 1992). Los factores principales para su venta son la gran durabilidad de sus flores y lo llamativo del perigonio. Nuevos cultivares, como también híbridos de *Alstroemeria* son producto de hibridaciones controladas, de mutaciones y selección artificial (Sanso 1996). Se han realizado cultivos de óvulos fertilizados artificialmente para la hibridación interespecífica (Hoshino 2008). Todos estos híbridos llegan a nuestro país como producto de importación para su comercialización (Muñoz & Moreira 2003). Entre las especies nativas de Sudamérica que se han considerado como parentales de los cultivares o como excelentes candidatos para su producción,

figuran *A. ligtu* L., *A. pelegrina* L., *A. aurea* Graham, *A. magenta* Bayer, *A. psittacina* J.G.C. Lehmann, *A. inodora* Herb., *A. pulchra* Sims, *A. violacea* Phil., *A. versicolor* Ruiz et Pavón y *A. caryophyllacea* Jacq. (Hoshino 2008). Distintas técnicas de biotecnología aplicada a la floricultura, se están usando en la obtención de híbridos entre especies de *Alstroemeria* nativas de Chile, entre ellas, *A. hookeri* (Shinoda & Murata 2003). Varias especies de *Alstroemeria* están formando complejos de varias entidades subespecíficas (subespecies o variedades) haciéndose muy difícil su reconocimiento. Esto podría deberse a los activos procesos microevolutivos que pueden estar experimentando las especies. Uno de estos complejos está constituido por las 4 subespecies de *A. hookeri* Lodd.: *A. hookeri* subsp. *hookeri*, *A. hookeri* subsp. *recumbens* (Herbert) Bayer, *A. hookeri* subsp. *maculata* Bayer y *A. hookeri* subsp. *cunningiana* (Herbert) Bayer (Bayer 1987). Sin embargo, Muñoz & Moreira (2003) solo reconocen las tres primeras subespecies, manteniendo a *A. cunningiana* Herbert a nivel específico. Lo relevante de este complejo es la potencial importancia económica que posee, dada la belleza de sus flores, lo que queda de manifiesto en la publicación de Muñoz & Moreira (2003).

Especialmente interesante es la subespecie típica de este complejo, *A. hookeri* subsp. *hookeri*. Esta subespecie es endémica de las Regiones del Maule y del Biobío, con una distribución disjunta a ambos lados de la Cordillera de la Costa. De este modo, existen poblaciones que crecen en la zona costera, entre los 5 y 20 m de altitud en las provincias de Arauco, Concepción, Ñuble y Cauquenes. Por otro lado, existen poblaciones que crecen en zonas del interior, entre los 100-150 m de altura, en las provincias de Biobío y Ñuble.

Observaciones preliminares en terreno mostraron diferencias morfológicas entre las poblaciones costeras y las del interior, específicamente en los caracteres florales (C

Baeza, observación personal). Por otro lado, se han documentado diferencias entre el cariotipo de las poblaciones costeras y del interior (Cajas et al. 2009, Baeza et al. 2010). De existir estas diferencias, es importante saber si van acompañadas por diferenciación genética en *A. hookeri* subsp. *hookeri*, ya que a través de procesos microevolutivos, podría estar ocurriendo divergencia de dos linajes genotípicamente distintos dentro de esta subespecie, separados por la Cordillera de la Costa.

De este modo, en el presente trabajo se plantean los siguientes objetivos: (1) estimar la variabilidad genética intra- e interpoblacional de esta subespecie, en todo su rango de distribución geográfica, a través de electroforesis aloenzimática, (2) evaluar la diferenciación y estructuración poblacional en *A. hookeri* subsp. *hookeri*, para comprobar si existen flujos génicos entre las poblaciones costeras y del interior, y (3) determinar si existe correspondencia entre la diferenciación genética y morfológica entre las poblaciones costeras y del interior.

## MÉTODOS

### *Recolección del material de estudio*

Se recolectaron plantas y semillas en 20 poblaciones, tratando de abarcar el rango completo de distribución geográfica de *A. hookeri* subsp. *hookeri* obteniendo las coordenadas geográficas de cada población (Tabla 1). Diez poblaciones corresponden al rango costero y 10 al interior (Fig. 1). Material de referencia fue depositado en el herbario CONC (Holmgren et al. 1990) de la Universidad de Concepción. Además, se mantuvieron en invernadero, plantas cultivadas de cada una de las poblaciones recolectadas. Paralelamente, se recolectaron hojas jóvenes de 30 individuos por población, para la extracción de aloenzimas. Las plantas fueron recolectadas en una transecta y separadas por al menos cinco metros una de otra, con el fin de asegurarse de obtener individuos diferentes, dado que las plantas se reproducen vegetativamente por rizomas. Para el estudio exomorfológico, se recolectaron tres a cinco individuos por población y se analizaron entre cuatro a seis flores por individuo.

### *Análisis aloenzimático*

Se utilizaron nueve sistemas aloenzimáticos: Glutamato deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.2), Fosfoglucomutasa (PGM, EC 2.7.5.1), Fosfoglucosa isomerasa (PGI, EC 5.3.1.9), Triosa fosfato isomerasa (TPI, EC 5.3.1.1), 6-Fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH, EC 1.1.1.44), Malato deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37), Shikimato

deshidrogenasa (SKDH, EC 1.1.1.25), Isocitrato deshidrogenasa ([NADP] IDH EC 1.1.1.44) y Alcohol deshidrogenasa (ADH, EC 1.1.1.1). El buffer de extracción fue: 0.1 M de tris-HCl (pH 7.5), 14 mM de 2-mercaptoetanol, 1 mM de EDTA (sal tetrasodio), 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de KCl y 5-10 mg de polivinilpirrolidona por cada 0.5 ml de buffer (Gottlieb 1981). Las enzimas se separaron en geles de almidón al 12 %, con diferentes sistemas de buffers. Para los sistemas TPI, ADH, GPI y PGM se usó TBE (Tris-Borato-EDTA) como buffer de corrida y para los sistemas MDH, PGD, IDH y SKDH se usó morfolinacitrato. La tinción se realizó de acuerdo a Weeden & Wendel (1989). De los zimogramas se obtuvo el genotipo de los individuos de cada población. Con el programa GenAlex versión 6.2 (Peakall & Smouse 2006) se calculó, para cada población, el número promedio de alelos por locus (Na), el porcentaje de loci polimórficos (P), la heterocigosidad observada ( $H_O$ ) y esperada ( $H_E$ ) de Nei (1973), el número de alelos privados (U) y el índice de fijación ( $F_{IS}$ ) de Wright (1951), obtenido como  $1 - H_O / H_E$ , de modo que valores positivos indican déficit de heterocigotos y valores negativos exceso de heterocigotos. La significancia estadística de los desvíos del equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) se estimó a través de un test de Chi<sup>2</sup>. Con el programa Arlequin 3.1 (Excoffier et al. 2005), se estimó la estructuración poblacional ( $F_{ST}$ ) para el total de las poblaciones y para las poblaciones costeras y del interior por separadas. Con este mismo programa se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), con el fin de determinar como se distribuye la variabilidad genética.

Para estimar la similitud genética entre todos los pares de poblaciones, se utilizó la distancia genética de Nei (1978). Las relaciones fenéticas se representaron a través de un dendrograma construido con el algoritmo "Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)", usando el programa TFPGA 3.1 (Miller 1997). Para determinar el soporte de cada nodo, con el mismo programa, se llevó a cabo un análisis de bootstrap con 1000 permutaciones. Para saber si existe correlación entre los valores de distancia genética y la distancia geográfica se realizó un test de Mantel (Smouse et al. 1986)

### *Análisis morfológico*

Se analizó un total de 71 individuos, 39 fueron recolectados en el rango costero y 32 en el interior. Del total de 56 caracteres considerados, 23 resultaron invariables y no se usaron en el estudio. Los 33 restantes fueron usados en el análisis, de los cuales 15 son cuantitativos continuos, seis cuantitativos discretos y 12 cualitativos doble estado. En la Tabla 2 se muestran los caracteres usados y sus respectivos estados (cuando correspondió).

Con los 71 individuos y los 33 caracteres, se construyó una matriz básica de datos, con la cual se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) para describir la variabilidad de los caracteres y las relaciones de similitud entre las poblaciones. Los datos fueron previamente estandarizados y dada su naturaleza se utilizó el coeficiente de correlación momento-producto de Pearson para el cálculo de la similitud fenética y cuyos valores se usaron para el ACP (Sneath & Sokal 1973, Crisci & López-Armengol 1983). Estos análisis se llevaron a cabo usando el programa NTSyS 2.02h (Rohlf 2005).

TABLA 1

Material examinado, depositado en el Herbario CONC. (C): Costa, (I): interior. Índices de variabilidad genética y de fijación para todas las poblaciones y analizadas por separado (C = costeras; I = del interior). N: número de individuos; Na: número promedio de alelos por locus; U: número de alelos privados; H<sub>O</sub>: Heterocigosidad observada; H<sub>E</sub>: heterocigosidad esperada; P: porcentaje de loci polimórficos; F<sub>IS</sub>: índice de fijación; Números entre paréntesis corresponden al error estándar; \*: desvío significativo del equilibrio H-W (P < 0.05).

Examined samples, deposited in CONC Herbarium. (C): Coast, (I): Central Valley. Genetic variability and fixation indices for all populations and separate analyses (C = coastal; I = Central Valley). N: number of individuals; Na: mean number of alleles per locus; U: number of private alleles; H<sub>O</sub>: observed heterocosity; H<sub>E</sub>: expected heterocosity; P: percentage of polymorphic loci; F<sub>IS</sub>: fixation index; Numbers in parentheses correspond to standard error; \*: significant H-W disequilibrium (P < 0.05).

Población / Localidad	Coord.	Fecha muestreo	msnm	N	Na	U	P	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	F <sub>IS</sub>
4181 (C) Lengua	36°46' S 73°09' W	20-12-2002	5	29.765(0.161)	1.235(0.136)	0	17.65	0.012(0.008)	0.011(0.008)	-0.043
4182 (C) Camino a Coronel, Stadio Italiano	36°54' S 73°08' W	20-12-2002	30	29.882(0.081)	1.176(0.128)	0	11.76	0.008(0.006)	0.008(0.006)	-0.034
4220 (C) Hualpén, entrada a Petrox	36°47' S 73°06' W	11-12-2004	10	12.000(0.000)	1.235(0.106)	0	23.53	0.025(0.014)	0.032(0.015)	0.226*
4221 (C) San Pedro, entrada Boca Sur	36°50' S 73°07' W	12-12-2004	5	6.941(0.059)	1.235(0.106)	0	23.53	0.017(0.017)	0.101(0.048)	0.834*
4224 (C) Colmuyao	36°15' S 72°48' W	14-12-2004	2	24.941(0.059)	1.118(0.081)	0	11.76	0.017(0.017)	0.019(0.015)	0.105
4227 (C) Trehuaco	36°26' S 72°40' W	14-12-2004	6	19.824(0.176)	1.235(0.106)	0	23.53	0.072(0.059)	0.063(0.034)	-0.143*
4226 (C) Cobquecura	36°07' S 72°48' W	14-12-2004	6	13.294(0.950)	1.294(0.143)	0	23.53	0.031(0.019)	0.028(0.017)	-0.096
4222 (C) Isla Rocuant	36°44' S 73°02' W	14-12-2004	2	14.000(0.000)	1.294(0.143)	0	23.53	0.113(0.064)	0.099(0.046)	-0.147*
4285 (C) Trehualemu	36°00' S 72°46' W	20-12-2007	20	11.176(1.674)	1.353(0.209)	1	35.29	0.160(0.071)	0.108(0.043)	-0.476*
4286 (C) Curaipe	35°50' S 72°37' W	20-12-2007	23	12.706(2.119)	1.412(0.173)	2	41.18	0.052(0.021)	0.048(0.019)	-0.097
4214 (I) km 3, camino de Laja a carretera 5 Sur	37°13' S 72°30' W	7-12-2004	100	23.765(0.136)	1.353(0.119)	0	35.29	0.040(0.021)	0.074(0.033)	0.456*
4218 (I) Quillón-Los Alemanes	36°46' S 72°24' W	7-12-2004	100	19.529(0.174)	1.471(0.125)	0	47.06	0.024(0.013)	0.090(0.029)	0.728*
4216 (I) Puente Ibañez, entre Yumbel y Cabrero	37°00' S 72°29' W	7-12-2004	100	23.941(2.397)	1.647(0.147)	0	58.82	0.080(0.032)	0.173(0.046)	0.538*
4215 (I) Yumbel	37°08' S 72°32' W	7-12-2004	100	12.647(0.866)	1.471(0.174)	0	35.29	0.047(0.033)	0.103(0.046)	0.544*
4187 (I) Estación Yumbel	37°09' S 72°32' W	30-12-2002	102	28.588(1.022)	1.529(0.151)	0	47.06	0.127(0.060)	0.118(0.042)	-0.072
4212 (I) Salida sur de Yumbel a carretera 5 Sur	37°08' S 72°27' W	7-12-2004	100	17.824(1.670)	1.706(0.166)	1	58.82	0.118(0.036)	0.147(0.039)	0.200
4217 (I) 3.5 km al norte de Cabrero, ruta 5 Sur	37°01' S 72°21' W	7-12-2004	100	19.706(0.294)	1.412(0.123)	0	41.18	0.152(0.066)	0.116(0.045)	-0.314*
4175 (I) Quillón-Puente El Roble	36°45' S 72°25' W	12-12-2002	64	23.706(0.294)	1.529(0.151)	0	47.06	0.171(0.080)	0.132(0.049)	-0.299*
4189 (I) Yumbel-Puente Perales	37°11' S 72°34' W	30-12-2002	120	27.529(0.471)	1.235(0.106)	0	23.53	0.071(0.058)	0.064(0.039)	-0.114*
4219 (I) Laguna Avendano	36°44' S 72°27' W	7-12-2004	70	16.706(2.259)	1.235(0.106)	0	23.53	0.011(0.007)	0.038(0.021)	0.708*
Media total				19.424(0.436)	1.359(0.031)	-	32.65(3.18)	0.067(0.010)	0.079(0.008)	0.125(0.030)
Media costa				17.45(6.658)	1.259(0.043)	-	23.53(2.91)	0.051(0.012)	0.052(0.009)	0.0129(0.039)
Media interior				21.39(0.532)	1.459(0.044)	-	41.76(3.97)	0.084(0.015)	0.106(0.013)	0.238(0.043)

## RESULTADOS

*Variabilidad genética*

Con los nueve sistemas aloenzimáticos se obtuvo resolución de 17 loci para las 20 poblaciones. El número de individuos por población, de los cuales se obtuvo resolución para todos los loci, varió entre 7 y 39 (véase Tabla C1 en Material Complementario). Los valores de variabilidad genética para todas las poblaciones se muestran en la Tabla 1. El porcentaje de loci polimórfico resultó bastante variable entre poblaciones, con un rango entre 11.76 % y 58.82 % y un promedio ( $\pm$  EE) de  $32.65 \pm 3.18$  % y el número promedio de alelos por locus varió entre 1.118 y 1.706 con un promedio de  $1.359 \pm 0.031$ . Además, fue posible detectar alelos privados en dos poblaciones costeras y una del interior (Tabla 1). Los valores de heterocigosidad observada ( $H_O$ ), para el total de las poblaciones y loci, variaron entre 0.008 y 0.171, con un promedio ( $\pm$  EE) de  $0.067 \pm 0.010$ . Los valores de heterocigosidad esperada

fluctuaron entre 0.008 y 0.173, con un promedio ( $\pm$  EE) de  $0.079 \pm 0.008$ . Al analizar las poblaciones de la costa y del interior por separado (Tabla 1), los valores de diversidad genética variaron con respecto al total. Estos valores resultaron más altos en las poblaciones del interior ( $H_O = 0.084$ ,  $H_E = 0.106$ ,  $P = 41.76$ ) que en las del rango costero ( $H_O = 0.051$ ,  $H_E = 0.052$ ,  $P = 23.53$ ). El índice de fijación promedio ( $F_{IS}$ ) para todas las poblaciones fue de 0.125 con un rango que fluctuó entre -0.476 y 0.834. Dos poblaciones de la costa y cinco del interior presentaron desvíos significativos del equilibrio H-W, hacia valores de  $F_{IS}$  positivos y seis poblaciones (tres de la costa y tres del interior), presentaron desvíos significativos hacia valores negativos, el resto de los valores no son significativos (Tabla 1). Del mismo modo, también hubo diferencias en la distribución de la variabilidad genética. Los resultados del análisis de AMOVA, considerando el total de las poblaciones, indican que la mayor variabilidad se da entre poblaciones (44.18 %), seguida de la variabilidad intrapoblacional (41.71 %) y



*Fig. 1:* Distribución geográfica de las poblaciones estudiadas. Números indican el número de cada población. Geographical distribution of studied populations. Numbers indicate population number.



finalmente entre rangos de distribución, costa-interior (14.1 %). Todos estos valores resultaron altamente significativos ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, al analizar las poblaciones de ambos rangos de distribución por separado, los resultados fueron diferentes. En las poblaciones costeras la variabilidad se da prácticamente dentro de las poblaciones (80.26 %), en cambio en las del interior la mayor variabilidad se da entre poblaciones (56.98 %), ambos valores significativos ( $P < 0.05$ ).

El valor de estructuración poblacional ( $F_{ST}$ ) para todos los loci y todas las poblaciones fue de 0.582. Para las poblaciones de la costa fue de 0.197 y para las del interior 0.318. Todos estos valores fueron significativos ( $P < 0.05$ ). El fenograma obtenido sobre la base de los valores de distancia génica de Nei (1978), se muestra en la Fig. 2. Se puede apreciar que son cuatro poblaciones del interior (4187, 4214, 4216, 4218) las que claramente se separan de las demás poblaciones. El resto de

TABLA 2

Caracteres seleccionados para el ACP y sus respectivos estados (cuando fueron necesarios).

Selected characters for PCA and their respective states (when needed).

Nº	Carácter	Estado
C1	Longitud de inflorescencia (cm)	
C2	Número de flores por inflorescencia	
C3	Grado de ramificación de la inflorescencia (1° - 8°)	
C4	Longitud del pedicelo (cm)	
C5	Longitud del tépalo 1 (cm)	
C6	Longitud del tépalo 2 (cm)	
C7	Longitud del tépalo 3 (cm)	
C8	Longitud del tépalo 4 (cm)	
C9	Longitud del tépalo 5 (cm)	
C10	Longitud del tépalo 6 (cm)	
C11	Número de nervios del tépalo 1	
C12	Número de nervios del tépalo 2	
C13	Número de nervios del tépalo 3	
C14	Nectario en el tépalo 1	Presencia (1), Ausencia (0)
C15	Nectario en el tépalo 2	Presencia (1), Ausencia (0)
C16	Nectario en el tépalo 3	Presencia (1), Ausencia (0)
C17	Nectario en el tépalo 6	Presencia (1), Ausencia (0)
C18	Mucrón en el tépalo 2	Presencia (1), Ausencia (0)
C19	Mucrón en el tépalo 4	Presencia (1), Ausencia (0)
C20	Mucrón en el tépalo 5	Presencia (1), Ausencia (0)
C21	Mucrón en el tépalo 6	Presencia (1), Ausencia (0)
C22	Ensanchamiento en la base del tépalo 1	Presencia (1), Ausencia (0)
C23	Ensanchamiento en la base del tépalo 6	Presencia (1), Ausencia (0)
C24	Número de manchas de los tépalos 4 y 5	
C25	Crenación en el tépalo 1	Presencia (1), Ausencia (0)
C26	Promedio de la longitud de las anteras (mm)	
C27	Promedio de la longitud de los filamentos (mm)	
C28	Desvío estándar longitud de los filamentos	
C29	Desvío estándar de la longitud de las anteras	
C30	Promedio del ancho de las anteras (mm)	
C31	Desvío estándar del ancho de las anteras	
C32	Longitud del estilo (mm)	
C33	Longitud del estigma (mm)	

las poblaciones se distribuyen en dos grandes ramas del fenograma, donde se mezclan poblaciones del interior y de la costa. Solamente una rama del árbol agrupa solo poblaciones costeras (4181, 4182, 4220 y 4226). Los resultados del test de Mantel indican que no existe correlación entre los valores de distancia genética y la distancia geográfica de las poblaciones ( $R^2 < 0,01$  con una significancia estadística para este valor, de  $P = 0.23$ ), situación que se ve reflejada al comparar el mapa de distribución de la Fig. 1 con el fenograma de la Fig. 2.

*Variabilidad morfológica*

El resultado del ACP (Fig. 3) obtenido a partir de la matriz básica de datos (véase Tabla C2 en Material Complementario), muestra la distribución de los 71 individuos analizados en el espacio representado por los tres primeros componentes. La distorsión de los datos en estos tres ejes fue menor al 9 %. El ACP muestra una amplia variabilidad morfológica entre los individuos analizados, no pudiendo reconocer claramente entre poblaciones costeras y del interior. Sin embargo, se puede apreciar una tendencia, en la cual la mayoría

de los individuos pertenecientes a poblaciones del interior se ubican hacia valores negativos del eje 2. Por el contrario hacia los valores positivos del mismo eje se agrupan la mayoría de los individuos de poblaciones costeras (Fig. 3A y 3B). En el centro se ubican individuos tanto de distribución costera como del interior. En la Tabla 3, se muestran los caracteres que más aportan a la variabilidad de cada componente.

DISCUSIÓN

Tres importantes factores inciden sobre los niveles de diversidad genética y su distribución en poblaciones naturales de plantas: (1) el sistema de reproducción, (2) la dispersión de las semillas y (3) el aislamiento reproductivo entre poblaciones. (Hamrick & Godt 1989, 1996, Hamrick & Nason 1996). Para *A. hookeri* subsp. *hookeri* estos tres factores en conjunto juegan un rol fundamental en los valores de variabilidad genética y estructuración poblacional. Con relación al primer punto, las características florales de *A. hookeri* subsp. *hookeri* hacen suponer un modo de reproducción cruzada asistida por insectos, tal

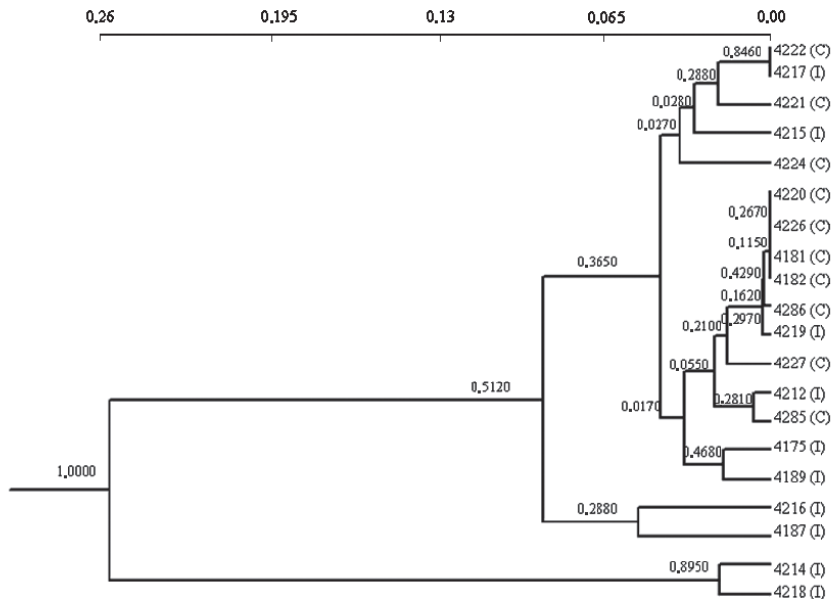
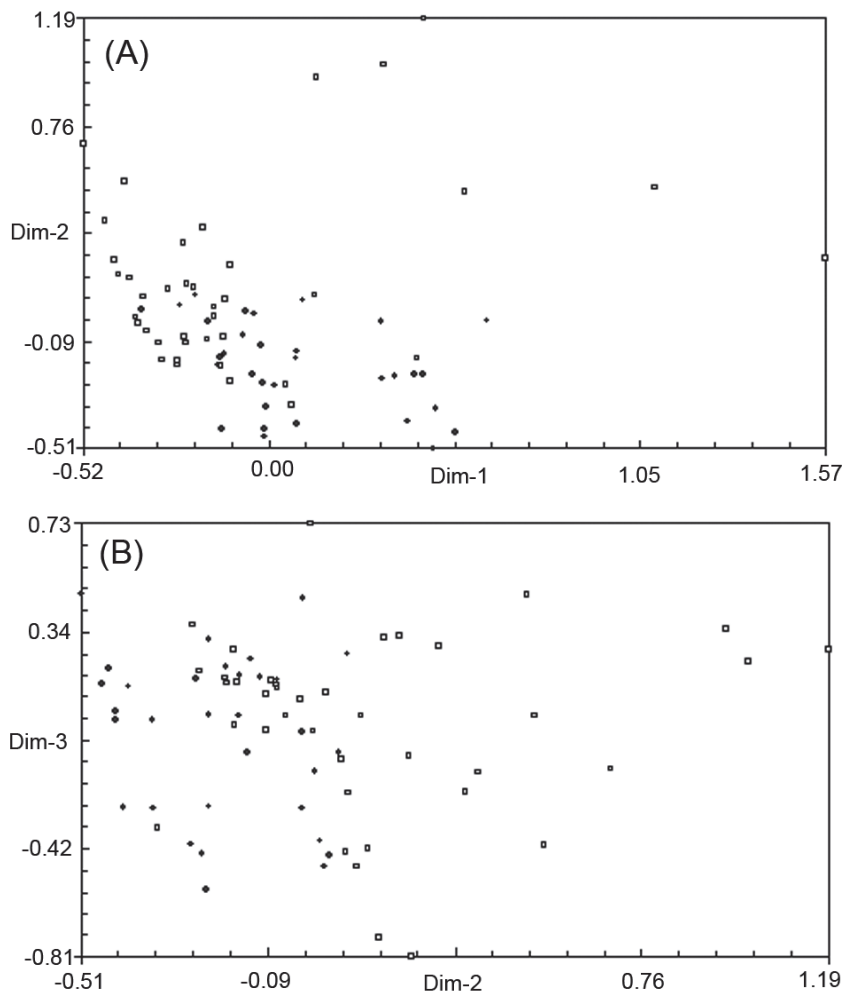


Fig. 2: Fenograma que representa las relaciones de similitud genética entre las poblaciones de *A. hookeri* subsp. *hookeri*. (C) = poblaciones costeras. (I) = poblaciones del interior.

Phenogram representing the genetic similarity relationships among populations of *A. hookeri* subsp. *hookeri*. (C) = coastal populations. (I) = Central Valley populations.

como se ha documentado para otras especies de *Alstroemeria* (Cavieres et al. 1998, Botto-Mahan & Ojeda-Camacho 2000, Suárez et al. 2009). Esto haría esperable una alta variabilidad intrapoblacional y baja variabilidad entre poblaciones (Hamrick & Godt 1996). Por otro lado, cuando hay autocompatibilidad y reproducción vegetativa, la situación es contraria, esperándose una baja variabilidad intrapoblacional y altos niveles de variabilidad interpoblacional (Hamrick & Godt 1996). Los valores promedio de variabilidad genética obtenidos en el presente trabajo ( $H_E = 0.079$ ;  $H_O$

$= 0.067$ ;  $P = 12.4$ ;  $N_a = 1.4$ ) estarían apoyando la segunda hipótesis. A pesar de que muy poco se sabe sobre la biología reproductiva de *A. hookeri* subsp. *hookeri*, se ha documentado que la mayoría de las especies de *Alstroemeria* son parcial o completamente autocompatibles (Rougier 2005), lo cual favorecería una baja diversidad genética intrapoblacional y alta variabilidad entre poblaciones. Sin embargo, la autocompatibilidad no significa necesariamente que exista autopolinización, de hecho, también se ha descrito que la protandria ocurre en el género, lo que resultaría clave para disminuir la



*Fig. 3:* Resultados del ACP, mostrando las relaciones de distancia entre las muestras morfológicamente analizadas. Cuadrados negros representan individuos de poblaciones del interior. Cuadrados blancos representan individuos de poblaciones costeras. A y B: dos diferentes vistas del espacio formado por los tres componentes principales.

Results of PCA, showing distance relationships among morphologically studied samples. Black squares represent individuals from Central Valley. White squares represent samples from Coastal range. A and B: two views of the space formed by the three principal components.



autofertilización. En el presente trabajo se detectó mucha variabilidad en el largo y coloración de las anteras y filamentos, en el tamaño y dehiscencia de las anteras y longitud del estilo, encontrándose cinco morfotipos florales distintos en todas las muestras analizadas morfológicamente, sin embargo, estas observaciones son preliminares y no se puede asegurar que en *A. hookeri* exista protandria, aunque el proceso se ha descrito como generalizado en el género (Muñoz & Moreira 2003). Otro aspecto importante a considerar es que las especies de *Alstroemeria* se reproducen vegetativamente a través de rizomas, lo que ayudaría a mantener altos niveles de estructuración genética, fenómeno que también ocurre en el complejo *A. hookeri*. Además, nuestros resultados son congruentes con los obtenidos para poblaciones de especies con sistema de reproducción cruzada, pero ocasionalmente con autopolinización ( $H_E = 0.09$ ;  $P = 29.2\%$ ; Hamrick & Godt 1996). También son congruentes con los obtenidos para *A. aurea* ( $H_E = 0.093$ ;  $H_O = 0.086$ ;  $P = 25\%$ ;  $N_a = 1.3$ ; Souto & Premoli 2003), una especie con atributos biológicos similares a *A. hookeri* subsp. *hookeri*. Similares índices de diversidad genética se han publicado para especies con rango geográfico limitado ( $H_E = 0.063$ ;  $P = 26.3\%$ ; Hamrick & Godt 1996), como lo es justamente *A. hookeri* subsp. *hookeri*.

Con relación al segundo punto, todas las especies de *Alstroemeria* diseminan sus semillas a través de un proceso explosivo (gravedad) de la cápsula (Rougier 2005), lo que indica que la dispersión de las semillas es relativamente restringida, si se compara con procesos de dispersión asistida por viento o animales. Al respecto, se ha documentado que para *A. aurea* las semillas tienen baja capacidad de diseminación (Souto et al. 2002). A pesar de que no se han hecho estudios detallados para *A. hookeri* subsp. *hookeri* y, dado que el proceso de diseminación de semillas es el mismo para todo el género, lo más probable que ocurra, es que esta subespecie también tenga una limitada capacidad de dispersión. En este sentido nuestros resultados de diversidad genética, son muy parecidos a los de *A. aurea*, apoyando esta hipótesis.

Considerando el tercer punto, *Alstroemeria hookeri* subsp. *hookeri*, presenta una distribución geográfica disjunta, a ambos lados de la Cordillera de la Costa en la Región del Biobío y del Maule (Fig. 1). Las poblaciones del rango costero, generalmente son muy extensas y con gran cantidad de individuos, en cambio las del interior están muy fraccionadas, creciendo entre plantaciones forestales y asentamientos humanos como pueblos y pequeñas ciudades (observación personal de

TABLA 3

Aporte de los principales caracteres a la variación de cada componente.

Contribution of the main characters to the variation of each component.

Componentes	Caracteres	Aporte
Componente 1	Presencia/ausencia del ensanchamiento basal del tépalo 4	-0.79
	Presencia/ausencia de las guías en el tépalo 6	0.77
	Presencia/ausencia del ensanchamiento basal del tépalo 6	0.75
	Crenación del tépalo 1	0.62
	Promedio de la longitud de los filamentos	0.62
	Longitud del estilo	0.6
	Patrón de manchas de los tépalos 4 y 5	0.52
Componente 2	Presencia/ausencia de mucrón en el tépalo interno inferior 2	0.89
	Presencia/ausencia de mucrón en el tépalo interno superior 5	0.89
	Presencia/ausencia de mucrón en el tépalo interno superior 4	0.86
Componente 3	Longitud del tépalo 3	0.75
	Longitud del tépalo 1	0.67

terreno). Esta separación espacial entre las poblaciones, hace que el flujo génico entre ellas se vea muy afectado dependiendo de la capacidad de vuelo de los polinizadores. Los resultados del análisis de AMOVA indican que la variabilidad genética radica principalmente entre poblaciones (44.18 %), seguida por la variabilidad intrapoblacional (41 %) y finalmente, la menor variabilidad se da entre ambos rangos de distribución (14.1 %). Estos valores son congruentes con el alto valor de estructuración genética ( $F_{ST} = 0.582$ ). Sin embargo, al analizar las poblaciones de ambos rangos de distribución por separado, los resultados del AMOVA y los valores de  $F_{ST}$  indican que la estructuración poblacional es significativamente menor en la costa que en el interior. Esta situación podría ser explicada por dos factores. Por un lado, la fragmentación poblacional a la que han estado expuestas las poblaciones del interior y la poca capacidad de diseminación de polen y semillas que tiene la subespecie. Ambos factores contribuyen a un flujo genético limitado entre poblaciones, lo que tendría como consecuencia una alta estructuración genética entre las poblaciones del interior. Este mismo hecho explica las grandes diferencias (14 veces) de los valores de  $F_{ST}$  entre zonas geográficas en *A. aurea* (Souto & Premoli 2003), donde la fragmentación y la conducta de los polinizadores han jugado un rol fundamental en los altos valores de  $F_{ST}$  encontrados para una localidad con alto grado de alteración, comparado con los bajos valores en sitios más prístinos (Souto & Premoli 2003). Además, se ha documentado que los polinizadores de *A. aurea* no vuelan más allá de un metro entre flores (Souto et al. 2002). Con respecto a los polinizadores de *A. hookeri*, no se tiene información acerca de las especies de insectos que intervienen, ni la conducta de estos en términos de la capacidad de vuelo entre poblaciones. Sin embargo, se han documentado varias especies de insectos que visitan las flores de diferentes especies de *Alstroemeria* (Aizen & Basilio 1998, Cavieres et al. 1998, Botto-Mahan & Ojeda-Camacho 2000, Souto et al. 2002, Souto & Premoli 2003, Suárez et al. 2009), lo que hace suponer que podrían también polinizar a *A. hookeri* subsp. *hookeri* y probablemente con poca capacidad de vuelo entre poblaciones, lo que estaría

siendo apoyado por los resultados de estructuración y del análisis de AMOVA.

Con respecto a las diferencias cariológicas (Cajas et al. 2009, Baeza et al. 2010) y morfológicas leves (este trabajo) que se han encontrado, los resultados genéticos no concuerdan con una separación entre poblaciones de la costa y del interior. Si bien es posible encontrar poblaciones del interior muy diferentes genéticamente al resto de las poblaciones, no se aprecian en el dendrograma agrupaciones claras separando ambos rangos de distribución geográfica. Sin embargo, a este respecto, no se pueden hacer afirmaciones concluyentes dado los bajos valores de bootstrap en casi todas las ramas del árbol. Un aspecto importante a considerar es que la diferenciación genética entre las poblaciones no es explicada por distancia geográfica, tal como lo demuestra el resultado del test de Mantel.

Finalmente, sobre la base de nuestros resultados, se puede concluir que los niveles de variabilidad genética y de estructuración poblacional detectados en *A. hookeri* subsp. *hookeri*, están altamente influenciados por el sistema de reproducción cruzada, probablemente con autofertilización ocasional, reproducción vegetativa a través de rizomas y baja capacidad de diseminación de polen y dispersión de semillas.

Desde el punto de vista de la conservación de esta subespecie, es importante considerar los altos valores de estructuración poblacional encontrados, el escaso número de alelos y la presencia de alelos únicos encontrados en algunas poblaciones, los que pudieran tener importancia selectiva frente a los cambios ambientales, que en la actualidad suceden dramática y vertiginosamente. Desde esta perspectiva, también es importante tener en cuenta los desvíos del equilibrio H-W hacia valores negativos, si bien varios de estos valores no son significativos, aquellos que sí lo son ( $P < 0.05$ ), indican exceso de heterocigotos en algunas poblaciones, información que debiera ser considerada al momento de un eventual plan de conservación de esta subespecie, conservando áreas donde se concentre mayor cantidad de variabilidad genética. Otro aspecto a considerar son aquellos lugares donde las poblaciones presentan alto déficit de heterocigotos (valores

significativamente mayores que cero), principalmente poblaciones del interior, donde las poblaciones están siendo afectadas, probablemente por reducción y fragmentación de su hábitat.

#### MATERIAL COMPLEMENTARIO

Las Tablas C1 y C2 están disponibles como Material Complementario online en [http://rchn.biologiacile.cl/pdfs/2010/4/MC\\_Ruiz\\_et\\_al\\_2010.pdf](http://rchn.biologiacile.cl/pdfs/2010/4/MC_Ruiz_et_al_2010.pdf).

#### AGRADECIMIENTOS

Se agradece a: FONDECYT 1070520, Universidad de Concepción DIUC 204.111.036-1.0, Dra. Denise Rougier, quien amablemente nos envió parte de su tesis doctoral, Dr. Cristian Torres-Díaz por sus valiosos aportes en el tratamiento estadístico de los datos.

#### LITERATURA CITADA

- AAGESEN L & M SANSO (2003) The phylogeny of the *Alstroemeriaceae*, based on morphology, rps16 Intron, and rbcL sequence data. *Systematic Botany* 28: 47-69.
- AIZEN MA & A BASILIO (1998) Sex differential nectar secretion in protandrous *Alstroemeria aurea* (*Alstroemeriaceae*): Is production altered by pollen removal and receipt? *American Journal of Botany* 85: 245-252.
- ARROYO MT, P MARQUET, C MARTICORENA, J SIMONETTI, L CAVIARES, F SQUEO, R ROÍZ & F MASSARDO (2008) El hotspot chileno, prioridad mundial para la conservación. En: Rovira J, J Ugalde & M Stutzin (eds) *Biodiversidad de Chile, patrimonio y desafíos: 90-93*. CONAMA, Ocho Libros Editores, Santiago, Chile.
- BAEZA C, E RUIZ & M NEGRITTO (2010) Comparative karyotypic analysis in the *Alstroemeria hookeri* Lodd. (*Alstroemeriaceae*) complex sensu Bayer (1987). *Genetics and Molecular Biology* 33: 119-124.
- BAYER E (1987) Die Gattung *Alstroemeria* in Chile. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* 24: 1-362.
- BOTTO-MAHAN C & M OJEDA-CAMACHO (2000) The importance of floral damage for pollinator visitation in *Alstroemeria ligula* L. *Revista Chilena de Entomología (Chile)* 26: 73-76.
- BUITENDIJK J & M RAMANNA (1996) Giemsa C-banded karyotypes of eight species of *Alstroemeria* L. and some of their hybrids. *Annals of Botany* 78: 449-457.
- BUITENDIJK J, E BOON & M RAMANNA (1997) Nuclear DNA content in twelve species of *Alstroemeria* L. and some of their hybrids. *Annals of Botany* 79: 343-353.
- CAJAS D, CM BAEZA, E RUIZ & MA NEGRITTO (2009) Análisis citogenético en poblaciones de *Alstroemeria hookeri* Lodd. ssp. *hookeri* (*Alstroemeriaceae*) en la Región del Bio-bio, Chile. *Gayana Botánica* 66: 117-126.
- CAVIERES LA, AP PEÑALOZA & MTK ARROYO (1998) Efectos del tamaño floral y densidad de flores en la visita de insectos polinizadores en *Alstroemeria pallida* Graham (*Amaryllidaceae*). *Gayana Botánica* 55: 1-10.
- CRISCI JV & MF LÓPEZ-ARMENGOL (1983) Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Monografía 26, Serie de Biología, Programa de Monografías Científicas, OEA, Washington DC.
- EXCOFFIER LG, G LAVAL & S SCHNEIDER (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- GOTTLIEB LD (1981) Electrophoretic evidence and plant populations. *Progress in Phytochemistry* 7: 1-46.
- HAMRICK JL & MJW GODT (1989) Allozyme diversity in plant species. En: Brown HD, MT Clegg, AL Kahler & BS Weir (eds) *Plant population genetics, breeding and germplasm resources: 43-63*. Sinauer, Sunderland, MA.
- HAMRICK JL & MJW GODT (1996) Conservation genetics of endemic plant species. En: Avise JC & JL Hamrick (eds) *Conservation genetics. Case histories from nature: 281-304*. Chapman and Hall, New York, USA.
- HAMRICK JL & JD NASON (1996) Consequences of dispersal in plants. En: Rhodes OE, RK Chesser & MH Smith (eds) *Population dynamics in ecological space and time: 203-235*. The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- HOLMGREN PK, NH HOLMGREN & LC BARNETT (1990) *Index herbariorum. Part I: The herbaria of the world, 8th edition*. New York Botanical Garden, New York, USA.
- HOSHINO Y (2008) *Advances in Alstroemeria Biotechnology*. En: Da Silva JAT (ed) *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: Advances and topical issues. Volume V: 540-547*. Global Science Books Ltd, Sapporo, Japan.
- JEU M, H SASBRINK, F GARRIGA-CALDERÉ & J PIKET (1992) Sexual reproduction biology of *Alstroemeria*. *Acta Horticulturae* 325: 571-575.
- LAZO I, R GINOCCHIO, H COFRÉ, Y VILINA & A IRIARTE (2008) Nuestra diversidad biológica. En: Rovira J, J Ugalde & M Stutzin (eds) *Biodiversidad de Chile, patrimonio y desafíos: 49-55*. CONAMA, Ocho Libros Editores, Santiago, Chile.
- MILLER MP (1997) Tools for population genetic analyses (TFPGA) ver. 1.3. A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Utah State University, Logan, Utah, USA.
- MIYAKE I (1989) Breeding spotless *Alstroemeria* in Japan. *Herbertia* 45: 40-44.
- MUÑOZ M & A MOREIRA (eds) (2003) *Alstroemerias de Chile. Diversidad, distribución y conservación*. Taller La Era, Santiago, Chile.
- NEI M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 70: 3321-3323.
- NEI M (1978) Estimation of average heterozygosity

- and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- PEAKALL R & PE SMOUSE (2006) GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- RAVENNA P (1988) New or noteworthy species of *Alstroemeria*. *Phytologia* 64: 281-288.
- ROHLF FJ (2005) NTSYSpc, version 2.20L. Exeter Software, Setauket, New York.
- ROUGIER D (2005) Evolución de caracteres florales relacionados con el sistema de reproducción en el género *Alstroemeria* L. (Alstroemeriaceae) en Chile. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- SANSO A (1996) El género *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) en Argentina. *Darwiniana* 34: 349-382.
- SANSO A (2002) Chromosome studies in Andean taxones of *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 138: 451-459.
- SHINODA K & M MURATA (2003) Cross-compatibility in interspecific hybridization of fifteen *Alstroemeria* species. *Journal of Japanese Society for Horticultural Science* 72: 557-561.
- SMOUSE PE, JC LONG & RR SOKAL (1986) Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Zoology* 35: 627-632.
- SNEATH P & R SOKAL (1973) Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. Freeman, San Francisco, USA.
- SOUTO CP, MA AIZEN & AC PREMOLI (2002) Effects of crossing distance and genetic relatedness on pollen performance in *Alstroemeria aurea* (Alstroemeriaceae). *American Journal of Botany* 89: 247-432.
- SOUTO CP & AC PREMOLI (2003) Genetic divergence among natural populations of *Alstroemeria aurea* D. Don: A dominant clonal herb of the understory in subalpine *Nothofagus* forests. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 44: 329-336.
- STEPHENS J, T TSUCHIYA & H HUGHES (1993) Chromosome studies in *Alstroemeria pelegrina* L. *International Journal of Plant Science* 154: 565-571.
- SUÁREZ LH, WL GONZÁLEZ & E GIANOLI (2009) Foliar damage modifies floral attractiveness to pollinators in *Alstroemeria exerens*. *Evolutionary Ecology* 23: 545-555.
- WEEDEN NF & JF WENDEL (1989) Genetics of plant isozymes. En: Soltis DE & PS Soltis (eds) *Isozymes in plant biology*: 5-45 Dioscorides Press, Portland, USA.
- WRIGHT S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics* 15: 323-354.

*Editor Asociado: Sylvain Faugeron*

*Recibido el 17 de agosto de 2009; aceptado el 30 de septiembre de 2010*