

CARACTERIZACIÓN DEL VALOR ORNAMENTAL DE HÍBRIDOS Y ESPECIES DEL GÉNERO *ALSTROEMERIA*

Danilo Aros^{1*}, Constanza Rivas², Amanda Donoso¹, Macarena Suazo¹, Michael Handford³ y Cristina Úbeda⁴

¹ Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. Chile.

² Vicerrectoría de Investigación y Doctorados, Universidad San Sebastián. Chile.

³ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Chile.

⁴ Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.

*Autor para correspondencia: daros@uchile.cl

RESUMEN

El género *Alstroemeria* pertenece a la familia *Alstroemeriaceae* y comprende 90 especies endémicas de Sudamérica, de las cuales alrededor de 38 especies y 19 taxones son nativos de Chile. Producto del mejoramiento genético realizado principalmente en Europa, EE.UU. y Japón, hoy en día la alstroemeria representa uno de los cultivos más importantes en el mercado de las flores de corte. Técnicas tales como mutagénesis inducida, poliploidización y principalmente cruzamientos interespecíficos, han sido utilizados para desarrollar las nuevas variedades que actualmente se comercializan en el mercado. Esta revisión tiene como objetivo dar a conocer algunos de los resultados obtenidos por el Grupo de Investigación en Floricultura (GIFLOR) de la Universidad de Chile, enfocados en la caracterización de los atributos de aroma y color de flores en alstroemeria, a través de diversas técnicas. En cuanto a la caracterización del color, se identificó 6-hidroxicianidina como la principal antocianidina asociada al color. Se identificó además un gen (*antocianidina sintetasa*, *ANS*) que podría estar asociado a la regulación del color rosado en la especie *A. pallida*. La caracterización aromática identificó un total de 42 compuestos volátiles, la mayoría de ellos monoterpenos. Además, se identificó un gen responsable de la producción de un monoterpeno asociado al aroma (*Alstroemeria terpeno sintetasa*, *AlstroTPS*) que presenta una mayor expresión en antesis (S2 y S3). Se concluye con la importancia de complementar diversas técnicas para una mejor caracterización del aroma y del color, para considerar estos caracteres en el mejoramiento genético de la alstroemeria.

Palabras claves: alstroemeria, aroma floral, color de flor, terpenos y antocianos.

ABSTRACT

The genus *Alstroemeria* belongs to the *Alstroemeriaceae* family and comprises 90 species endemic to South America, of which approximately 38 species and 19 taxa are native to Chile. Through breeding carried out mainly in Europe, USA and Japan, alstroemeria is currently one of the most important crops in the cut flower market. Techniques such as induced mutagenesis, polyploidisation and mainly interspecific crosses, have been used to develop the new varieties that are presently commercialised in the market. This review presents some of the results obtained by the Floriculture Research Group (GIFLOR) of the University of Chile, focusing on the characterisation of alstroemeria flower aroma and colour, using various techniques. Regarding the characterisation of colour, 6-hydroxycyanidin was identified as the main anthocyanidin associated with this trait. Moreover, an *anthocyanidin synthetase* (ANS) gene could be associated with the regulation of pink colour in the species *A. pallida*. The aromatic characterisation identified a total of 42 volatile compounds, most of them monoterpenes. In addition, a gene responsible for the biosynthesis of an aroma-associated monoterpene (*Alstroemeria terpene synthetase*, *AlstroTPS*) that is most highly expressed in anthesis (S2 and S3) was identified. In conclusion, it is important to complement various techniques for a fuller characterisation of aroma and colour, in order to consider these characters in the breeding of alstroemeria.

Keywords: alstroemeria, floral scent, flower colour, terpenes and anthocyanins.

INTRODUCCIÓN

La familia *Alstroemeriaceae* en su más reciente revisión, contiene cinco géneros en el mundo: (i) *Bomarea*, el cual contiene 120 especies dispersas en todo el continente americano; (ii) *Alstroemeria*, el cual cuenta con 90 especies nativas de Sudamérica, distribuidas en su mayoría en el sur del subcontinente y el este de Brasil; (iii) *Luzuriaga*, que contiene 3 especies en Chile y una en Nueva Zelanda; (iv) *Drymophila* con solo una especie en el territorio australiano; y (v) *Leontochir*, el más recientemente descubierto y con solo una especie endémica del Desierto de Atacama (Finot *et al.*, 2018). Dentro de esta familia, Chile es el país que cuenta con la mayor diversidad de especies del género *Alstroemeria* con alrededor de 38 especies y 19 taxones (Muñoz y Moreira, 2003).

Las especies del género *Alstroemeria* son hierbas perennes y se caracterizan por tener flores zigomorfas, vistosas y de diversos colores, con tallos erectos, hojas resupinadas, y un sistema de rizomas que permite su propagación vegetativa (Aagesen y Sanso, 2003). Además, las especies de este género presentan una marcada protandria, es decir, las anteras maduran entre los estados S3 y S4, mientras que el gineceo recién comienza a mostrarse receptivo en S5 (Figura 1). Este fenómeno favorece la polinización cruzada y por ende la biodiversidad dentro del género.



Figura 1. Evolución de la maduración de las anteras y el estigma en flores de *Alstroemeria* cv. "Ajax" en tres estados de desarrollo (S3, S4 y S5, según Wagstaff *et al.*, 2001).

Considerando los atributos ornamentales de la alstroemeria, muchas especies fueron cultivadas en Jardines Botánicos en Europa. Además, comenzó a realizarse mejoramiento genético, principalmente en Europa, EE.UU. y Japón, lo que tuvo como resultado que hoy en día la alstroemeria represente uno de los cultivos más importantes en el mercado de las flores de corte (Lim *et al.*, 2012), y más recientemente como planta en maceta (Bridgen, 2018).

Los primeros híbridos de alstroemeria fueron obtenidos a partir de la hibridación interespecífica entre dos especies chilenas (*A. aurea* R. Graham y *A. violacea* Phil.) (Vonk Noordegraaf, 1981) a partir de los cuales siguieron desarrollándose otros híbridos (Tombolato, 1993). Sin embargo, persistían las barreras al hacer cruzamientos entre especies chilenas y brasileñas, observándose frecuentemente aborto de embriones (De Jeu *et al.*, 1992). En 1995, De Jeu y Jacobsen determinaron que las principales barreras generadas en los cruzamientos interespecíficos ocurrían post fertilización con inhibiciones de la elongación del tubo polínico. A partir de este descubrimiento comenzó a desarrollarse el rescate de embriones, como un método exitoso para la obtención de híbridos a partir de cruzamientos interespecíficos. De esta manera, se han realizado cruzamientos utilizando numerosas especies de alstroemeras, entre las que destacan: i) Especies chilenas: *A. aurea*, *A. pelegrina*, *A. magnifica*, *A. angustifolia*, *A. diluta*, *A. garaventae*, *A. hookeri*, *A. ligtu*, *A. magenta*, *A. presliana*, *A. pulchra*, *A. versicolor*, *A. zoellneri*, ii) Especies brasileñas: *A. inodora*, *A. caryophyllaea*, *A. psittacina*, entre otras (Hoshino *et al.*, 2008). De este modo, se aprovecharon atributos tanto de las especies chilenas (atractivo y tamaño de sus flores, largo de vara floral) como de las especies brasileñas (calidad del follaje y floración permanente, ya que no presentan dormancia).

Los programas de mejoramiento genético de alstroemeria, principalmente establecidos en Holanda, han considerado el tamaño de flor, la vida postcosecha y la resistencia o tolerancia a estreses bióticos y abióticos como principales criterios de selección. Sin embargo, en menor medida se han considerado caracteres asociados a la satisfacción del consumidor, como son el color y el aroma (Aros *et al.*, 2016). Estudios sensoriales han demostrado que el color y el aroma son los atributos más importantes para un consumidor que se dispone a comprar una flor, tanto en Reino Unido (Aros *et al.*, 2015) como en Chile (Aros *et al.*, 2020) (Tabla 1).

Tabla 1. Percepción de consumidores chilenos y británicos de flores, respecto al atributo más apreciado al comprar flores. Se utilizó una escala de 1 (=extremadamente en desacuerdo) a 5 (=extremadamente de acuerdo).

Atributos	Apreciación	
	Chile	Reino Unido
Color de flor	4,84 c	4,73 c
Aroma floral	4,27 b	4,35 c
Vida en florero	3,75 a	3,73 b
Tamaño de flor	3,68 a	3,28 ab
Largo vara	3,74 a	2,75 a

* Los valores corresponden al promedio (n=80). Letras diferentes en la columna indican diferencia estadística de acuerdo al test de Tukey (p<0,05).

Respecto al aroma, ésta es una característica que presentan algunas flores y su función específica es la de atraer polinizadores (Raguso, 2008; Dudareva *et al.*, 2013). El aroma floral es producto de la liberación de compuestos orgánicos volátiles, entre los que se encuentran principalmente terpenos, aromáticos y derivados de ácidos grasos (Dudareva y Pichersky, 2000). En el caso del género *Alstroemeria*, existe sólo una especie descrita como aromática, *A. caryophyllaea*, la cual es endémica de Brasil (Assis, 2004). A partir de esta especie, se han generado algunos cultivares aromáticos (Ej.: “Sweet Laura” y “Ajax”), aunque sigue siendo un carácter muy poco estudiado en este género.

En relación al color, este carácter está relacionado con la acumulación de pigmentos en las flores, los cuales se dividen en tres grupos según su estructura química, localización celular y vía de síntesis bioquímica: carotenoides, flavonoides y alcaloides. Los flavonoides son el grupo más abundante de pigmentos, los cuales producen el espectro más amplio de colores, que van desde el amarillo pálido al azul-violeta y, a su vez, dentro de estos destacan los antocianos (Zhao y Tao, 2015). Su síntesis está regulada por genes de la ruta biosintética de los antocianos, y además por factores de transcripción que juegan un papel importante en el desarrollo del color de flores, a través de la regulación de la expresión temporal y espacial de los genes estructurales (Xie *et al.*, 2006).

Esta revisión tiene como objetivo dar a conocer algunos de los resultados obtenidos por el Grupo de Investigación en Floricultura (GIFLOR) de la Universidad de Chile, en relación al estudio del aroma y el color en especies nativas del género *Alstroemeria*. Estos resultados fueron obtenidos en el marco de proyectos concursables de investigación, memorias de pregrado y tesis de magister y doctorado, aportando además información de trabajos previamente publicados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para los estudios de evaluación del color y aroma floral de alstroemeria, se utilizaron especies nativas chilenas (*A. pallida*, *A. umbellata*) y brasileñas (*A. caryophyllaea*) y el cultivar aromático “Sweet Laura”. Además, se utilizaron híbridos provenientes de cruzamientos entre líneas de *A. caryophyllaea* (híbridos DANCAR) (Aros *et al.*, 2015) y cruzamientos entre especies nativas y cultivares (híbridos CORUCH) (Aros *et al.*, 2019) desarrollados en la Universidad de Chile.

Caracterización del Aroma

Evaluación sensorial. Para evaluar el aroma floral de alstroemeria se realizaron evaluaciones sensoriales utilizando un panel no entrenado compuesto por 70 individuos, mediante una prueba de grado de satisfacción en base a una escala hedónica continua cuyos extremos eran: “me gusta extremadamente” (9) y “me disgusta extremadamente” (1). Además, se evaluó la intensidad del aroma utilizando una escala de intervalo con los siguientes parámetros extremos: “extremadamente alto” (9) y “extremadamente bajo” (1). Para realizar el análisis estadístico del estudio de percepción sensorial, todas las escalas utilizadas fueron traducidas a valores numéricos.

Evaluación instrumental. Para determinar los principales compuestos volátiles que forman parte del aroma floral de alstroemeria, se realizó un análisis mediante cromatografía de gases usando como detector el espectrómetro de masas. La unidad experimental correspondió a una flor en estado S4 (Wagstaff *et al.*, 2001). La extracción de los compuestos aromáticos de la flor se realizó mediante el método de micro extracción en fase sólida del espacio de cabeza o Headspace Solid Phase Microextracción (HS-SPME). Los genotipos “Sweet Laura” y DANCAR fueron analizados siguiendo el método en Aros *et al.* (2012) y el híbrido 14E08 según Aros *et al.* (2019). Finalmente, el perfil volátil del híbrido 13M07 se analizó empleando una fibra triple de 2 cm de Carboxen/DVB/PDMS (Supelco, Bellefonte, PA, EE.UU.). Esta fibra se expuso al espacio de cabeza del vial contenedor de la flor durante 30 minutos. Tras la extracción, la fibra se inyectó en el cromatógrafo en modo “splitless” (3 min) a 280 °C (Aros *et al.*, 2012). Para llevar a cabo el análisis se empleó un cromatógrafo 7890B acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5977 inert (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.) y columna capilar DB Wax de 60 m metros (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.). El programa de temperatura fue el siguiente: 35 °C por 1 min y luego se elevó a 130 °C subiendo 12 °C/min, luego 160 °C a 1 °C/min manteniéndose 5 min y finalmente a 10 °C/min a 220 °C (manteniendo a esta temperatura durante 10 minutos).

Caracterización molecular. Para evaluar la expresión de genes asociados a la producción de aroma, se realizó la amplificación y posterior cuantificación relativa del gen *AltroTPS*, previamente aislado y caracterizado como participante en la ruta metabólica de monoterpeno

(Aros *et al.*, 2012). La amplificación por RT-PCR en tiempo real se realizó utilizando un termociclador ABI 7900 (Applied Biosystems, Monza, Italia), en un volumen de reacción final de 6 μ L conteniendo 3 μ L de Mix SYBR Green (AppliedBiosystems, Warrington, RU), 5 pmol de cada partidor (SIGMA, Aldrych) y aproximadamente 20 ng de ADNc. Se utilizaron los genes *18S* (Aros *et al.*, 2012) y *eEF1A* (Hirai *et al.*, 2012) como genes de referencia.

Evaluación del color

Evaluación fenotípica. La caracterización visual del color de flores de alstroemeria se realizó *in situ*, sobre el tercio medio de los tépalos externos, utilizando la RHS mini colour chart (The Royal Horticultural Society & Flower Council Holland, Londres, 2005). Cada evaluación se realizó sobre 3 individuos distintos que presentaran el mismo color visual.

Caracterización antociánica. Se utilizó aproximadamente 300 mg de tejido de los tépalos externos y se realizó una extracción con 10 mL de mezcla de MeOH:HCO₂H:H₂O (10:3:3), agitando durante una hora a 175 rpm. Los extractos obtenidos se llevaron a sequedad en un rotavapor (R-210, Buchi, Agilent 1200 series) a 35°C. El pellet fue resuspendido en 200 μ L de solución MeOH:H₂O (1:1) filtrada con filtro de 0,22 μ m millipore Millex-GV PVDF y puesto en un vial. Posteriormente, cada extracto filtrado (n=20) fue inyectado en el cromatógrafo (Agilent technologies, serie 1200, California, EE.UU.). La separación fue conducida usando una columna Simetry C18 (4,6 x 250 mm, Waters Corp.) con un tamaño de partícula de 5 μ m. Se registró la información espectral en la longitud de onda 280 y 520 nm para determinar la concentración de las antocianinas de forma relativa a malvidina 3-glucósido.

Caracterización molecular. Se realizó amplificación y posterior cuantificación relativa de la expresión de genes claves de la ruta de biosíntesis de antocianos. La amplificación por RT-PCR en tiempo real se realizó utilizando un Eco real-time PCR system (Illumina, BC-100-1001, California, EE.UU.), en un volumen de reacción final de 10 μ L conteniendo 5 μ L de Mix SYBR Green (AppliedBiosystems, California, EE.UU.), 0,25 μ M de cada partidor (SIGMA, Aldrich) y aproximadamente 40 ng de ADNc. Cada reacción se realizó por triplicado (3 réplicas técnicas). Se utilizaron los genes *18S* y *eEF1A* como genes de referencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tanto el color como el aroma son características propias de cada especie y están muy relacionadas con el desarrollo de la floración, debido a que estos caracteres tienen como principal función atraer polinizadores al momento de la antesis (Weiss, 1991; Raguso, 2008). En alstroemeria, Wagstaff *et al.* (2001) ha definido 8 estados de desarrollo floral (S0–S7) a partir de la observación de la floración del cultivar Samora. Estos estados de desarrollo se definen como: S0= Botón coloreado; S1= apertura del primer tépalo; S2= apertura floral completa; S3= tres anteras dehiscentes; S4= seis anteras dehiscentes; S5= aparición de

estigma con líquido estigmático visible; S6= pérdida de color y comienzo del marchitamiento de tépalos; y S7= abscisión de los tépalos marchitos. Estos estados de desarrollo son muy útiles para la caracterización de otros atributos y en este estudio se caracterizó este proceso en la especie *A. caryophyllaea* y el cultivar “Sweet Laura” (Figura 2).

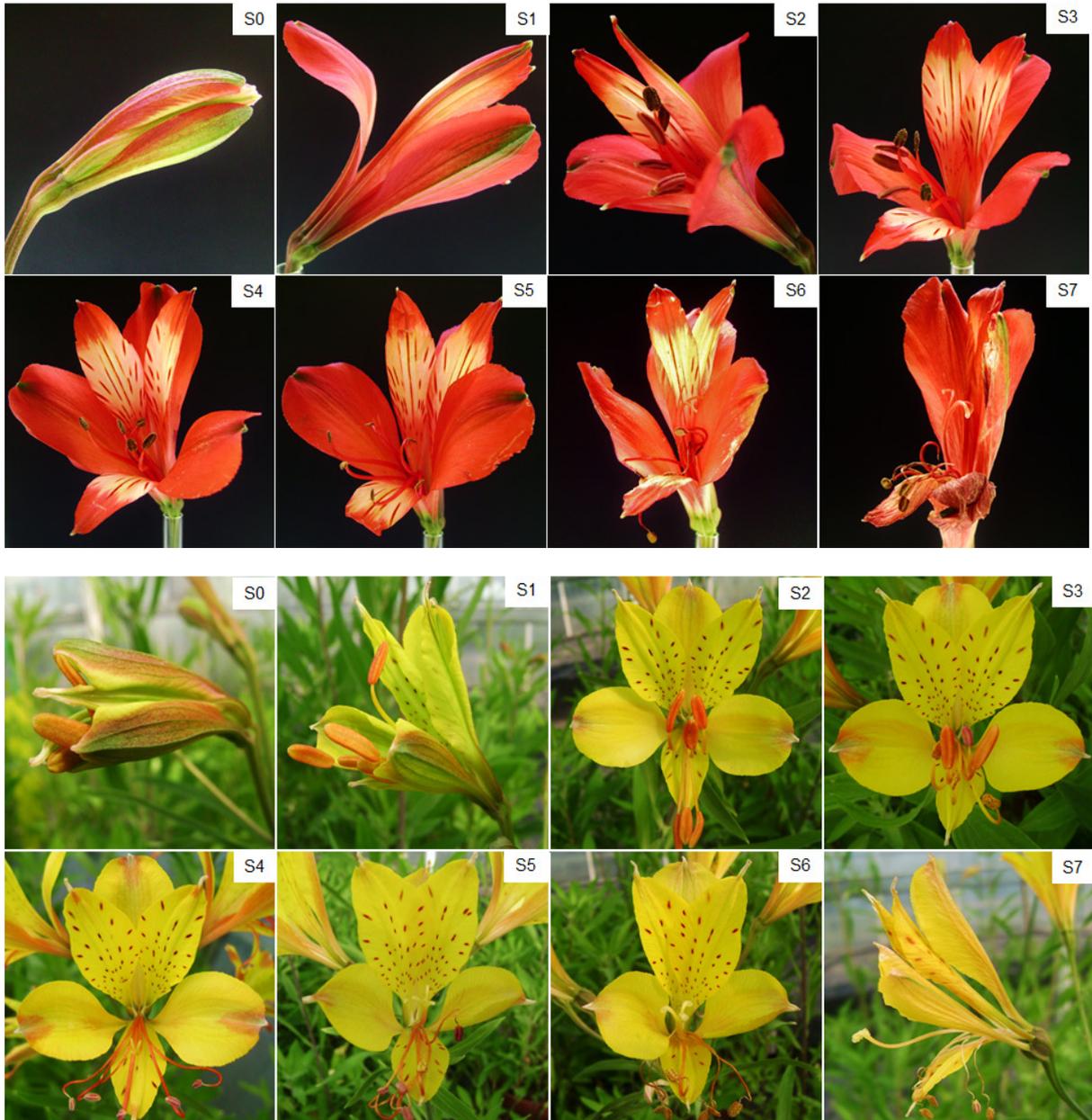


Figura 2. Estados de desarrollo identificados en la especie *Alstroemeria caryophyllaea* (arriba) y el cultivar “Sweet Laura” (abajo), de acuerdo a lo previamente descrito por Wagstaff *et al.* (2001). Fuente: Aros (2010).

Evaluación del aroma floral

Análisis sensorial del aroma floral. La evaluación sensorial del aroma de flores de híbridos "DANCAR" reveló que en general todos los híbridos fueron descritos positivamente por el panel, con valores que fluctuaron entre 6,9 (híbrido 17) y 5,9 (DANCAR 004), es decir, entre 'me gusta moderadamente' (=7) y me gusta ligeramente (=6). Respecto a la intensidad del aroma, el híbrido DANCAR 004 presentó una intensidad significativamente menor (3,6) en comparación con el resto de los híbridos, los cuales estuvieron entre 'ligeramente alto' (=6) y 'ni bajo ni alto' (=5) (Figura 3).

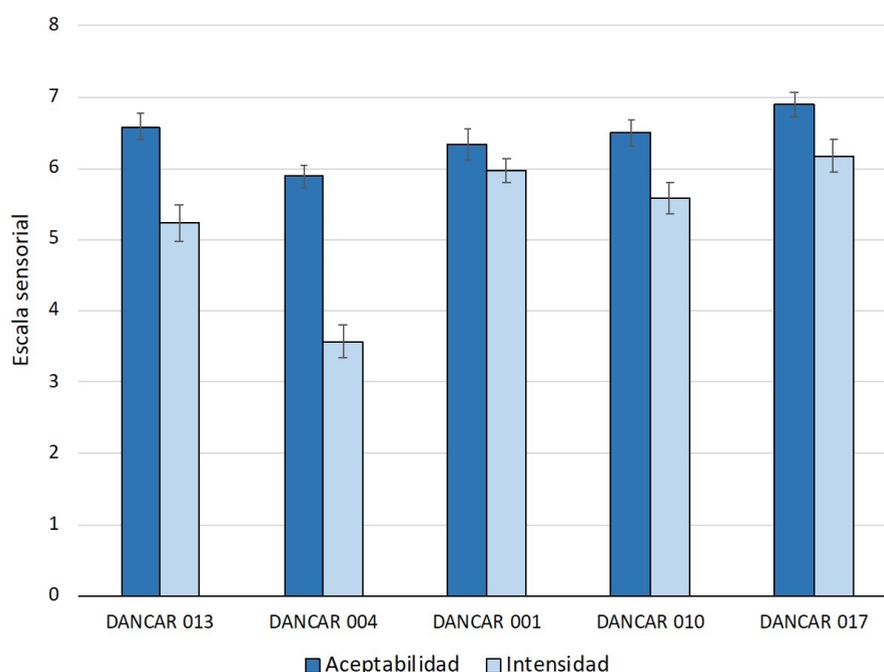


Figura 3. Análisis sensorial que considera la evaluación de la intensidad y la aceptabilidad del aroma de cinco híbridos de alstroemeria. Las barras representan el error estandar (n=70). Fuente: Aros (2010).

Los resultados revelaron cierta correlación entre la intensidad y la aceptabilidad, considerando que los valores más altos fueron observados en DANCAR017, mientras que los valores más bajos en DANCAR004. Es decir, aparentemente cuanto más intenso es el aroma, mayor fue el grado de aceptabilidad. Esta correlación ha sido previamente descrita en estudios que utilizaron perfumes (Distel, 1999) y además descrita como una 'U invertida' (Moskowitz, 1977), donde la percepción positiva asociada a la intensidad llega a un máximo, para luego convertirse en una correlación negativa.

Caracterización del aroma floral. La caracterización del aroma floral realizado mediante GC-MS, identificó un total de 42 compuestos orgánicos volátiles distintos en los 4 genotipos de alstroemeria evaluados. La gran mayoría de estos compuestos corresponden a terpenos (58,9%), específicamente a monoterpenos (46,4%) donde los compuestos más frecuentes fueron los isómeros de pineno, ocimeno y limoneno. Aparte de compuestos terpénicos, se identificaron ésteres, alcoholes y aldehídos (Tabla 2).

Tabla 2. Lista de compuestos volátiles identificados en tres híbridos y un cultivar de alstroemeria (Aros *et al.*, 2012; Aros *et al.*, 2015; Aros *et al.*, 2019). Se incluyen el grupo químico al que pertenece cada compuesto y su respectiva descripción aromática.

Nombre	Grupo	Descripción aromática*	Genotipo
α -pineno	Monoterpeno	Pino, trementina	 <p>Híbrido 14 E08</p>
b-thujene	Monoterpeno	N/I**	
β -pineno	Monoterpeno	Pino, resina, trementina	
Limoneno	Monoterpeno	Limón, naranja	
Eucalyptol	Monoterpeno	Menta, dulce	
E- β -ocimeno	Monoterpeno	Dulce, herbal	
Z-ocimeno	Monoterpeno	Cítrico, herbal, floral	
γ -terpineno	Monoterpeno	Pino, plástico	
Allo-ocimeno	Monoterpeno	N/I	
3-thujene	Monoterpeno	N/I	
α -pineno	Monoterpeno	Pino, trementina	
Sabineno	Monoterpeno	Pimienta, trementina, madera	
Mirceno	Monoterpeno	Mosto, especia, balsámico	
3-careno	Monoterpeno	Limón, resina	
D-limoneno	Monoterpeno	Limón, naranja	
β -trans-ocimeno	Monoterpeno	Herbáceo, floral, verde, terpénico	
γ -terpineno	Monoterpeno	Pino, plástico	
Terpinoleno	Monoterpeno	Dulce, pino	
Allo-ocimeno	Monoterpeno	N/I	
Cariofileno	Sesquiterpeno	Madera, especia	
α -cariofileno	Sesquiterpeno	N/I	
Hexanal	Aldehído	Pasto, sebo, grasa	
Etilanisol	Alcohol	N/I	

β -ocimeno	Monoterpeno	Herbáceo, verde, terpénico
Isocariofileno	Sesquiterpeno	Madera
α -cariofileno	Sesquiterpeno	N/I
α -farneseno	Sesquiterpeno	Madera, dulce
Biciclo	Sesquiterpeno	N/I
Azuleno	Sesquiterpeno	N/I
Benceno	Aromático	Gasolina
Fenol	Aromático	Fenol
Alcohol de cinamilo	Aromático	Jacinto, floral
Naftaleno	Aromático	Alquitrán
Ácido butanóico	Ácido	Rancio, desagradable
(-)- β -pineno	Monoterpeno	Pino, resina, trementina, madera
D-limoneno	Monoterpeno	Limón, naranja
Eucaliptol	Monoterpeno	Pine, eucalyptus, herbal, alcanfor
β -trans-ocimeno	Monoterpeno	Herbáceo, floral, verde, terpénico
β -ocimeno	Monoterpeno	Herbáceo, verde, terpénico
3-Careno	Monoterpeno	Limón, resina
4-metil-2-pentil acetato	Éster	N/I
Acetato de hexilo	Éster	Fruta, hierba
Methyl hexanoato	Éster	Fruta, fresco, dulce
Metil octanoato	Éster	Naranja
Etil octanoato	Éster	Fruta, grasa
Benzoato de metilo	Éster	Ciruela pasa, lechuga, herbal, dulce
Salicilato de metilo	Éster	Pimienta
Trans-3-Hexenil acetato	Éster	N/I
o-Cymeno	Aromático	N/I
Mesitileno	Aromático	Pesticida
1,1-Dimetil-3-metileno-2-vinylcyclohexano	*	N/I
Hexanol	Alcohol	Resina, flor, verde
cis-3-Hexen-1-ol	Alcohol	Grasa, verde
2-metil- 6-Heptenol	Alcohol	N/I
Hexanal	Aldheído	Pasto, sebo, grasa
6 metil-Hepten-2-one	Cetona	Grasa, verde, cítrico



A. cv. 'Sweet Laura'



Híbrido 13 M07

* La descripción aromática fue consultada desde Flavornet (www.flavornet.org) y Pubchem (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound).

** N/I se refiere a que no se obtuvo información de estos compuestos.

En términos cuantitativos (relativos o absolutos según fue el análisis), los compuestos en mayor abundancia fueron los siguientes: E- β -ocimeno (híbrido 14E08), mirceno (híbrido DANCAR), isocariofileno (“Sweet Laura”) y salicilato de metilo (híbrido 13 M07). No obstante, es importante aclarar que no necesariamente son estos los compuestos responsables del aroma percibido de estas flores (Aros *et al.*, 2020). Además, considerando la diversidad de compuestos volátiles identificados y las diferencias que existen entre los compuestos más abundantes en cada genotipo, se confirma la hipótesis de que el carácter del aroma es de herencia compleja (Amrad *et al.*, 2016). Así, a pesar de que todos estos genotipos tienen como parental común *A. caryophyllaea*, única especie aromática descrita dentro del género, la composición del aroma resulta ser bastante diversa.

Caracterización molecular. Se identificó y caracterizó el primer gen asociado a la producción de aroma (mirceno) en alstroemeria. Este gen se denominó Alstroemeria terpeno sintetasa (*AlstroTPS*), correspondió a una secuencia de 567 aminoácidos (Aros *et al.*, 2012) y su expresión fue evaluada en los genotipos aromáticos *A. caryophyllaea* y *A. cv.* “Sweet Laura”. Se observó una mayor expresión de este gen hacia los estados S2 y S3, principalmente en el cultivar “Sweet Laura”. Además, cuantitativamente, el cultivar “Sweet Laura” presentó una expresión muy superior a *A. caryophyllaea* (Figura 4).

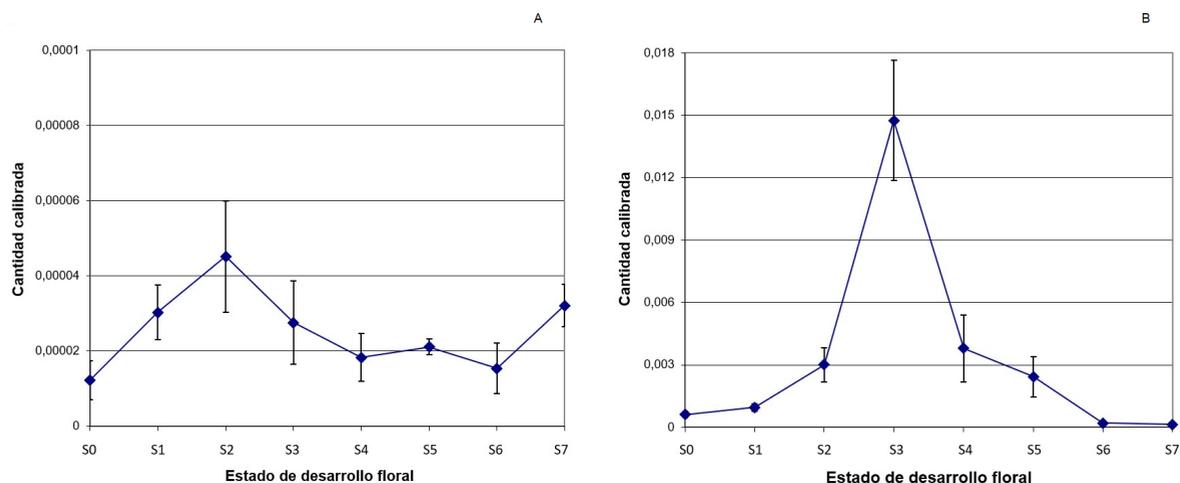


Figura 4. Expresión de *AlstroTPS* en 8 estados de desarrollo floral en A) *Alstroemeria caryophyllaea* y B) *A. cv.* “Sweet Laura”. Las barras representan el error estándar (n=12). Fuente: Aros (2010).

Al igual que la composición química del aroma, la expresión de genes asociados a su biosíntesis también resulta difícil de interpretar ya que *A. cv.* “Sweet Laura” es un híbrido que, a pesar de provenir directamente de *A. caryophyllaea*, presenta un patrón de expresión del gen *AlstroTPS* distinto, principalmente en términos cuantitativos. Tal como se mencionó anteriormente, este carácter resulta complejo de seguir de una generación a otra (Amrad *et al.*, 2016). Por otro lado, la mayor expresión observada en los estados S2 y S3 está

relacionada con el inicio de la emisión de polen desde las anteras, y justo antes de que la flor alcance plena anthesis y la máxima emisión de aroma (S4). Por lo tanto, esto además confirma la función del aroma floral en la atracción de polinizadores (Dudareva *et al.*, 2013).

Evaluación del color de flor

Fenotipo. Utilizando la carta de colores, se logró identificar 5 accesiones para *A. pallida*, incluyendo desde flores de color blanco (RHSN999D, RHSN155B), hasta de color rosado (RHS68C). Para *A. umbellata* se identificaron cuatro accesiones, que fueron desde el rosado claro (RHS56A) hasta el rosado oscuro (RHS61D) (Figura 5).

Color	Código RHS	Color	<i>A. pallida</i>	<i>A. umbellata</i>
Blanco	RHS N999D		x	
	RHS 155B		x	
Rosado claro	RHS 56C		x	
	RHS 56A			x
	RHS 65B		x	
Rosado	RHS 64D			x
	RHS 68C		x	x
Rosado oscuro	RHS 61D			x

Figura 5. Caracterización fenotípica del color de tépalos de *Alstroemeria pallida* y *A. umbellata*, evaluada mediante una RHS mini colour chart. Se indican los nombres y los códigos RHS de cada color observado.

Estos datos demuestran la diversidad intraespecífica que presentan las especies del género *Alstroemeria*, probablemente debido a la polinización cruzada que las caracteriza. Específicamente para las especies de la Cordillera de los Andes, se ha sugerido que esta polinización es mediada por insectos de la clase hymenoptera (Cavieres *et al.*, 1998). La diversidad de colores encontrada en esta especie podría tener consecuencias ecológicas, tal como se ha estudiado previamente en términos del comportamiento de insectos polinizadores (Paine *et al.*, 2019) y la frecuencia del ataque de herbívoros (Vaidya *et al.*, 2018). Esta variación intraespecífica del color de flor ha sido estudiada previamente y se ha descrito que aparentemente ocurre de manera aleatoria en plantas (Bohm, 1987).

Antocianos. A través del análisis de caracterización antociánica de tépalos de *A. pallida*, se identificó solo un compuesto, el cual según sus λ_{\max} correspondería a la antocianidina 6-hidroxicianidina (Saito *et al.*, 1985) (Figura 6).

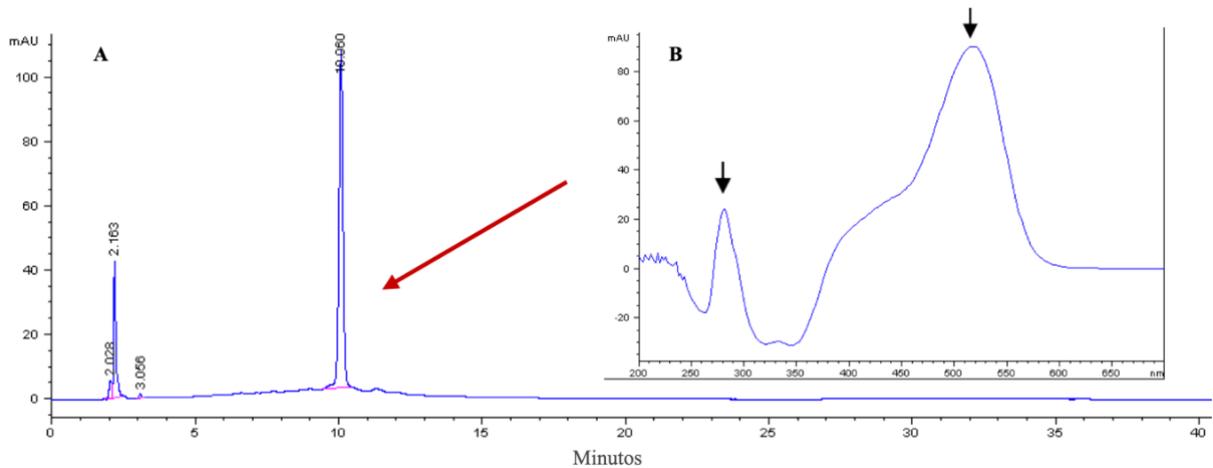


Figura 6. Cromatograma a 520nm (A) y espectro de absorción (B) de antocianidinapresente en las cinco accesiones de *Alstroemeria pallida*. Flecha roja indica *peak* que correspondería a 6-hidroxicianidina en el cromatograma. Flechas negras indican los máximos en el espectro de absorción. mAU: unidades de miliabsorbancia.

Considerando que solo se identificó un compuesto, es posible que existan otros pigmentos glicosilados que estarían aportando al color de tépalos, tal como los descritos en el estudio realizado en alstroemeria por Nørbæk *et al.* (1996). Sin embargo, sería necesario utilizar técnicas más avanzadas tales como HPLC-MS o UPLC-MS para realizar una caracterización más precisa de estos compuestos (Xu *et al.*, 2018; Du *et al.*, 2018). Finalmente, como era de esperar, la concentración relativa de esta putativa 6-hidroxicianidina en cada una de las accesiones, mostró que la accesión más pálida (RHSN999D) posee una concentración relativa casi nula de esta antocianina en comparación con las demás accesiones.

Caracterización molecular. Entre todos los genes evaluados, se logró amplificar exitosamente antocianidina sintetasa (*ANS*) y chalcona sintetasa (*CHS*). *CHS* participa en el comienzo de la ruta de síntesis de antocianinas, permitiendo la formación de chalconas. Por otro lado, *ANS* participa en la penúltima etapa de esta ruta, permitiendo la obtención de antocianidinas coloreadas a partir de leucoantocianina (To y Wang, 2006). La expresión relativa de *CHS* se mantiene constante en las cinco accesiones de *A. pallida*, mientras que la expresión de *ANS*, en general, presentó mayores valores relativos en accesiones de flores con tonalidades más rosadas (Tabla 3).

Tabla 3. Expresión relativa de los genes antocianidina sintetasa (*ANS*) y chalcona sintetasa (*CHS*) en tépalos de flores de 5 accesiones de *Alstroemeria pallida*.

Accesión	Expresión relativa	
	ANS	CHS
RHSN999D	1,57 b	2,72 a
RHS155B	5,57 a	2,67 a
RHS56C	1,31 b	0,55 a
RHS65B	5,56 a	0,98 a
RHS68C	10,85 a	3,59 a

* Letras diferentes en la columna indican diferencia estadística de acuerdo al test de Tukey ($p < 0,05$).

Este patrón de expresión coincide parcialmente con la concentración de 6-hidroxicianidina, lo cual sugiere que el gen *ANS* poseería un rol importante en la acumulación de este pigmento. Este gen ha sido previamente identificado como clave en la pigmentación floral de otras especies, en donde la ausencia de su expresión se ha asociado a flores blancas (Nakatsuka *et al.*, 2007) o con coloración muy pálida (Shimizu *et al.*, 2011). Sin embargo, *ANS* podría no ser el único gen responsable, tal como se ha descrito anteriormente (Li *et al.*, 2014). En este sentido, es importante estudiar otros genes para llegar a comprender la ruta metabólica completa de la biosíntesis de antocianos en esta especie.

CONCLUSIONES

El color y el aroma floral son los caracteres más importantes en los cultivos ornamentales y deben ser considerados en los programas de mejoramiento genético. En el caso particular de alstroemeria, si bien existe una diversidad enorme en cuanto al color de la flor, no hay suficientes esfuerzos por desarrollar el carácter del aroma. Es altamente probable que esto se deba a la escasez de este carácter dentro del género (sólo una especie descrita como aromática), pero seguramente la herencia cuantitativa que presenta el aroma sea la razón más importante. Además, el color es un carácter relativamente sencillo de caracterizar y fenotipar, mientras que el aroma es un carácter mucho más complejo y que depende mucho del evaluador y puede presentar heredabilidad baja. Por esta razón, el complemento de diversas técnicas (sensoriales, visuales, instrumentales) puede que sea la mejor alternativa para la caracterización del aroma y el color.

Finalmente, junto con la caracterización de estos atributos, es importante también el estudio de las rutas biosintéticas y los genes asociadas a la producción de metabolitos secundarios que dan origen al color y el aroma. De esta manera se llega a un mejor entendimiento de estos caracteres y además, sería posible conducir de manera más eficiente un programa de mejoramiento genético utilizando selección asistida con marcadores.

AGRADECIMIENTOS

CONICYT N.º 791100024, FONDECYT de Iniciación N.º 11130325, FONDEQUIP N.º EQM130129, Gobierno de Chile. Programa U-inicia, Vicerrectoría de Asuntos Académicos, Universidad de Chile.

REFERENCIAS

AAGESEN, L.; SANZO, A.M. 2003. The phylogeny of the *Alstroemeriaceae*, based on morphology, rps16 Intron, and rbcL sequence data. *Systematic Botany* 28(1), 47-69.

AMRAD, A.; MOSER, M.; MANDEL, T.; DE VRIES, M.; SCHUURINK, R.C.; FREITAS, L.; KUHLEMEIER, C. 2016. Gain and loss of floral scent production through changes in structural genes during pollinator-mediated speciation. *Current Biology* 26, 3303–3312.

AROS, D. 2010. Floral scent evaluation of *Alstroemeria*. Tesis para optar al grado de doctor. Cardiff University, School of Biosciences. Cardiff, Reino Unido. 258 p.

AROS, D.; GONZALEZ, V.; ALLEMANN, R.K.; MÜLLER, C.T.; ROSATI, C.; ROGERS, H.J. 2012. Volatile emissions of scented *Alstroemeria* genotypes are dominated by terpenes, and a myrcene synthase gene is highly expressed in scented *Alstroemeria* flowers. *Journal of Experimental Botany* 63(7), 2739-2752.

AROS, D.; SPADAFORA, N.; VENTURI, M.; NÚÑEZ-LILLO, G.; MENESES, C.; METHVEN, L.; MÜLLER, C.T.; ROGERS, H.J. 2015. Floral scent evaluation of segregating lines of *Alstroemeria caryophyllaea*. *Scientia Horticulturae* 185, 183-192.

AROS, D.; RIVAS, C.; TOLEDO, M.; CÉSPEDES, C.; CORTÉS, C.; SANTANDER, M.A.; VÁSQUEZ, M.; ÁLVAREZ, N.; DONOSO, A.; PRAT, M.L. 2016. Chilean native species from the Andes Mountains: an attractive source of germplasm for ornamental plant breeding. *Acta Horticulturae (ISHS)* 1171, 375-380.

AROS, D.; SUAZO, M.; RIVAS, C.; ZAPATA, P.; ÚBEDA, C.; BRIDGEN, M. 2019. Molecular and morphological characterization of new interspecific hybrids of *Alstroemeria* originated from *A. caryophyllaea* scented lines. *Euphytica* 215 (5), 93.

- AROS, D., GARRIDO, N., RIVAS, C., MEDEL, M., MÜLLER, C., ROGERS, H., AND ÚBEDA, C. 2020. Floral scent evaluation of three cut flowers through sensorial and gas chromatography analysis. *Agronomy* 10(1), 131.
- ASSIS, M.C. 2004. *Alstroemeriaceae* no estado do Rio de Janeiro. *Rodriguésia* 55 (85), 5-15.
- BAYER, E. 1987. Die Gattung *Alstroemeria* in Chile. *Mitt. Bot. Staats München* 24, 1-362.
- BOHM, B.A. 1987. Intraspecific flavonoid variation. *The Botanical Review* 53(2), 197.
- BRIDGEN, M.P. 2018. *Alstroemeria*. En: Van Huylbroeck J. (eds) *Ornamental Crops. Handbook of Plant Breeding*, vol 11. Springer. Cham. pp. 231-236
- CAVIERES, L.; PEÑALOZA, A.P.; ARROYO, M.T.K. 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.
- DE JEU, M.J.; SASBRINK, H.; GARRIGA, F.; CALDERE, F.; PIKET, J. 1992. Sexual reproduction biology of alstroemeria. *Acta Horticulturae* 325, 571-576.
- DE JEU, M.J.; JACOBSEN, E. 1995. Early postfertilization ovule culture in *Alstroemeria* L. and barriers to interspecific hybridization. *Euphytica* 86(1), 15-23.
- DISTEL, H.; AYABE-KANAMURA, S.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, M.; SCHICKER, I.; KOBAYAKAWA, T.; SAITO, S.; HUDSON, R. 1999. Perception of everyday odors—correlation between intensity, familiarity and strength of hedonic judgement. *Chem. Senses* 24, 191-199.
- DU, H.; LAI, L.; WANG, F.; SUN, W.; ZHANG, L.; LI, X.; WANG, L.; JIANG, L.; ZHENG, Y. 2018. Characterisation of flower colouration in 30 *Rhododendron* species via anthocyanin and flavonol identification and quantitative traits. *Plant Biology* 20(1), 121-129.
- DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J.K.; KAPLAN, I. 2013. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist* 198(1), 16-32.
- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. 2000. Biochemical and Molecular Genetic Aspects of Floral Scents. *Plant Physiology* 122, 627-633.
- FINOT, V.; BAEZA, C.; MUÑOZ-SCHICK, M.; RUIZ, J.; ESPEJO, E.; ALARCÓN, D.; CARRASCO, P.; NOVOA, P.; EYZAGUIRRE, M.T. 2018. *Guía de Campo Alstroemerias Chilenas*. Ed. Corporación Chilena de la Madera, Concepción, Chile. 292 p.
- HIRAI, M.; YAMAGISHI, M.; KANNO, A. 2012. Reduced transcription of a LEAFY-like gene in *Alstroemeria* sp. cultivar Green Coral that cannot develop floral meristems. *Plant Science* 185, 298-308.
- HOSHINO, Y. 2008. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*. Global Science Books, UK. Vol. 5. Chapter 51, pp. 540-547.

- LI, Q.; WANG, J.; SUN, H.Y.; SHANG, X. 2014. Flower color patterning in pansy (*Viola × wittrockiana* Gams.) is caused by the differential expression of three genes from the anthocyanin pathway in acyanic and cyanic flower areas. *Plant Physiology and Biochemistry* 84, 134-141.
- LIM, S.S.; LEE, S.I.; KANG, S.C.; KIM, J.B. 2012. *Alstroemeria* plants and its biotechnological applications. *J. Plant Biotechnology* 39(4), 219-24.
- MOSKOWITZ, H.R. 1977. Intensity and hedonic functions for chemosensory stimuli. *The Chemical Senses and Nutrition*. Academic Press, New York, 71-101.
- MUÑOZ, M.; MOREIRA, A. 2003. *Alstroemerias de Chile: Diversidad, Distribución y Conservación*. Santiago, Taller La Era. 140 p.
- NAKATSUKA T.; ABE, Y.; KAKIZAKI, Y.; YAMAMURA, S.; NISHIHARA, M. 2007. Production of red- flowered plants by genetic engineering of multiple flavonoid biosynthetic genes. *Plant Cell Report* 26, 1951-1959.
- NØRBÆK, R.; CHRISTENSEN, L.P.; BOJESEN, G.; BRANDT, K. 1996. Anthocyanins in the Chilean species of *Alstroemeria*. *Phytochemistry* 42, 97-100.
- PAINE, K.C.; WHITE, T.E.; WHITNEY, K.D. 2019. Intraspecific floral color variation as perceived by pollinators and non-pollinators: evidence for pollinator-imposed constraints?. *Evolutionary Ecology* 33(4), 461-479.
- RAGUSO, R. A. 2008. Start making scents: the challenge of integrating chemistry into pollination ecology. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 128 (1), 196-207.
- SAITO N., YOKOI, M.; YAMAJI, M.; HONDA, T. 1985. Anthocyanidin glycosides from the flowers of *Alstroemeria*. *Phytochemistry* 24, 2125-2126.
- SHIMIZU, K.; OHNISHI, N.; MORIKAWA, N.; ISHIGAMI, A.; OTAKE, S.; RABAH, I.O.; SAKATA, Y.; HASHIMOTO, F. 2011. A 94- bp deletion of anthocyanidin synthase gene in acyanic flower lines of lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 80 (4), 434-442.
- TO, K.Y.; WANG, C.K. 2006. Molecular breeding of flower color. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology* 1, 300-310.
- TOMBOLATO, A.F.C.; BURCHI, G.; BIANCHINI, C.; BREGLIANO, R.; SCHIVA, T. 1993. Interspecific crosses on *Alstroemeria*. En: Proc. of the XVIIth EUCARPIA Symposium "Creating Genetic Variation in Ornamentals" (Schiva, T., Mercuri, A. Eds.), 301-307.
- VAIDYA, P.; MCDURMON, A.; MATTOON, E.; KEEFE, M.; CARLEY, L.; LEE, C.R.; BINGHAM, R.; ANDERSON, J.T. 2018. Ecological causes and consequences of flower color polymorphism in a self-pollinating plant (*Boechera stricta*). *New Phytologist* 218 (1), 380-392.

- VONK NOORDEGRAAF, C. 1981. Bloemproductie bij *Alstroemeria* 'Walter Fleming'. Meded 69: 1–152.
- WAGSTAFF, C.; ROGERS, H.; LEVERENTZ, M.; THOMAS, B.; CHANASUT, U.; STEAD, A. 2001. Characterisation of *Alstroemeria* vase life. *Acta Horticulturae* 543, 161-175.
- WEISS, M. R. 1991. Floral colour changes as cues for pollinators. *Nature* 354(6350), 227-229.
- XIE D.Y.; SHARMA, S.B.; WRIGHT, E.; WANG, Z.Y.; DIXON, R.A. 2006. Metabolic engineering of proanthocyanidins through co-expression of anthocyanidin reductase and the PAP1 MYB transcription factor. *Plant Journal* 45 (6), 895-907.
- XU, W.; LUO, G.; YU, F.; JIA, Q.; ZHENG, Y.; BI, X.; LEI, J. 2018. Characterization of anthocyanins in the hybrid progenies derived from *Iris dichotoma* and *I. domestica* by HPLC-DAD-ESI/MS analysis. *Phytochemistry* 150, 60-74.
- ZHAO, D.Q.; TAO, J. 2015. Recent advances on the development and regulation of flower color in ornamental plants. *Frontiers in Plant Science* 6, 261.