

**SISTEMÁTICA DEL COMPLEJO *Iresine diffusa* E *Iresine herbstii*
(AMARANTHACEAE; GOMPHRENOIDEAE) DE COLOMBIA**

**SYSTEMATICS OF *Iresine diffusa* AND *Iresine herbstii* COMPLEX (AMARANTHACEAE;
GOMPHRENOIDEAE) FROM COLOMBIA**

CARLOS ALBERTO AGUDELO HENAO¹

Programa de Biología, Centro de Estudios e Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología –
CIBUQ, Universidad del Quindío.

¹ Tesis Doctoral, realizada en la Universidad del Valle, Depto de Biología, finalizada en Diciembre de 2008. Comité de tesis conformado por: Philip A. Silverstone Sopkin (Director), Heiber Cardenas Henao (U. Valle), Gerardo Gallego S. (CIAT), César A. Velásquez Ruiz (U. Nacional Medellín) y Michael Nee (Jardín Botánico de New York).

RESUMEN

Se realizó la caracterización integral mediante cuatro estudios de exomorfología, polen, anatomía y molecular del complejo *Iresine diffusa* H. & B. ex Willd. e *Iresine herbstii* Hook., que crecen en Colombia. El estudio fue ejecutado con el apoyo de las Universidades del: Quindío, Valle, Nacional de Medellín y Cauca. Además del Centro de Investigación en Agricultura Tropical CIAT. Se evaluaron 404 variables y 30.400 datos. Todas las especies mostraron granos de polen: en mónadas, esferoidales, apolares, radiales, pantoporados y membrana poral con cuerpos de ectexina, tectum con espinulas cónicas y perforaciones. Los tricomas se clasificaron como pluricelulares, simples, largos, delgados y uniseriados, presentando tres variantes. Estomas anisocíticos y paracíticos de forma simultánea y haces vasculares tipo Kranz. A nivel molecular se encontraron 204 bandas, numerosos alelos privados en los morfotipos de *I. diffusa*. Taxonómicamente, se propuso mantener el estatus de especies separadas para *Iresine diffusa* e *I. herbstii* y elevar siete de los ocho morfotipos estudiados al rango de especie, cuatro de ellos son especies nuevas (*I. retusifolia*, *I. minicaulis*, *I. pachycaulis* e *I. bullata*) y se recobra el estatus de especie para *I. spiculigera*. Se propone otra especie nueva (*I. grandistaminodia*) y se hallaron dos especies (*I. laxa* e *I. pedicellata*) que son primer registro para el país. Se concluye que el género es monofilético, pero las especies involucradas en el estudio son parafiléticas. En Colombia el género *Iresine* queda constituido por 11 especies, por lo cual es el país con mayor número de especies reportadas hasta el momento.

PALABRAS CLAVES. Amaranthaceae, *Iresine diffusa*, *Iresine herbstii*, anatomía, polen, morfología, AFLP's

Recibido: Agosto 30 de 2009

Aceptado: Noviembre 16 de 2009

Correspondencia: Avenida Bolívar con Calle 12 N, Bloque de Ciencias Básicas y Tecnologías,
Piso 4to, Fax 096-7460151, e-mail: agudelohenao@yahoo.com

ABSTRACT

The integral characterization was made through four exomorphology, pollen, anatomy and molecular studies of the complex *Iresine difusa* H & B. ex Willd. and *Iresine herbstii* Hook that grow in Colombia. The study was executed with the support of the universities of Quindío, Valle, Nacional of Medellín and Cauca. Besides of the Center of Research in Tropical Agriculture CIAT. There were tested 404 variables and 30.400 data. All the species showed pollen grains in coins, spheroids, apolars, radials, pantoporates and poral membrane with bodies of ectexina, tectum with conic spinules and perforations. The trichomes were classified as multicellular, simple, large, thin and uniseriate presented three variants. Anisocytic and paracytic stomata in a simultaneous way and vascular bundle type Kranz. There were found 204 bands at the muscular level, numerous private alleles in the morphotypes of *Iresine difusa*. Taxonomically, It was proposed to maintain the species status separated for *Iresine difusa* and *Iresine herbstii* and elevating seven from eight studied morphotypes to the rank of specie, four of them are new species (*I. retusifolia*, *I. minicaulis*, *I. pachycaulis* and *I. bullata*) and the status of specie is recovered for *I. spiculigera*. Another specie is proposed (*I. grandistaminodia*) and two species were discovered (*I. laxa* and *I. pedicellata*) that are the first register for the country. It concludes that the genus is monophyletic but the species involved in the study are paraphyletics. In Colombia, the genus *Iresine* is constituted by 11 species therefore is the country with the major number of species brought until this moment.

KEY WORDS. Amaranthaceae, *Iresine difusa*, *Iresine herbstii*, anatomy, pollen, morphology, AFLP's

INTRODUCCION

Amaranthaceae ha sido tratada en varias floras de América, Europa y África (1, 2). Todos estos trabajos han llevado a la identificación de cerca de 90 géneros y 900 especies. Respecto a *Iresine herbstii* Hook., se tienen las publicaciones de Perú (3), Flora Catarinense (4), Flora de Pakistan (2), Ecuador (1), Colombia (5) y Venezuela (6). Sobre *I. difusa*

H. & B. ex Willd. están las descripciones de (1, 4, 6). La publicación clave fue en la que se sinonimizó a *I. celosia* con *I. difusa*, y desde entonces este último ha sido aceptado (7).

Los problemas abordados en este estudio fueron planteados inicialmente en el tratamiento para la Flora de Ecuador (1), ya que definió a *Iresine difusa* H. & B. ex Willd. como “una especie muy variable y de una sinonimia extensa”, e

incluso le describió dos variedades (*diffusa* y *spiculigera*). Igualmente, afirmó que cuando las formas extremas son comparadas, ellas sugieren que son especies diferentes. La variedad *spiculigera*, tiempo atrás tratada como *Iresine spiculigera* Seub., ha sido incluida dentro de *I. diffusa* en algunas flora modernas (1, 8), por lo cual, argumentó que con el estado de conocimiento actual no es posible mantener las dos especies como diferentes y reconoce sólo una especie con dos variedades (1). Así mismo, planteó que la especie conocida como *I. herbstii* Hook., de la cual existen dos morfotipos, no puede ser distinguida de *I. diffusa* por las características florales y concluye que *I. herbstii* podría ser acomodada dentro de ella (1).

En la monografía de *Amaranthaceae* de la Flora de Colombia (5), se trató a *Iresine diffusa* como un “complejo de especies” y manifestó que en el país existen varios morfotipos, es la especie con mayor número de ejemplares (ca. 2000) en los herbarios, es la que exhibe mayor variación morfológica (4-6 morfotipos), la de más amplio rango altitudinal (crece de 0 a 3500 m) y ha sido históricamente la especie del género y de la familia con mayor confusión taxonómica, por lo cual sugirió la necesidad de desarrollar estudios profundos y de diversa índole (genéticos, anatómicos, moleculares y palinológicos), para aclarar la taxonomía de la especie.

La importancia del estudio se relaciona con la dificultad para hacer evaluaciones fitoquímicas de este grupo de especies y morfotipos, pues al no ser clara su taxonomía cualquier ensayo químico prácticamente carece de valor. Esta situación no es conveniente, porque ambas especies tienen variados usos populares en la medicina tradicional en el país (9). *I. herbstii* es, además, usada como ornamental. También hacen parte de nuestra biodiversidad y son de origen americano. El objetivo general del estudio era evaluar la variabilidad exomorfológica, molecular, anatómica y palinológica del complejo *Iresine diffusa* H. & B. ex Willd. e *Iresine herbstii* Hook. que crecen en Colombia, con el fin de identificar sus relaciones filogenéticas y determinar si se trata de una o varias especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimientos generales. Se evaluaron cinco morfotipos de *Iresine diffusa*: *bullifolia*, *minicaule*, *triblanca*, *tribronce* y *pachycaule*. De *I. herbstii* se evaluaron tres morfotipos: *retusa*, *variegata* y *eliptifolia*. Se realizó salidas de campo al volcán Galeras, Pasto (Nariño), Popayán (Cauca), Laguna de La Herrera (Mosquera) y alrededores de Bogotá (Cundinamarca), a los municipios de Medellín y Río Negro (Antioquia) y a los municipios de Armenia, Calarcá, La Tebaida y Salento (Quindío), para obtener muestras vegetales. De cada morfotipo se tomaron muestras de diez individuos diferentes,

para un total de 80 muestras. De cada individuo se tomaron fragmentos adecuados para los cuatro tipos de análisis (anatómico, molecular, morfológico y polínico). La morfometría, tanto cualitativa como cuantitativa, se efectuó mediante el Sistema de Análisis de Imágenes Leica QWIN.

Métodos para el estudio polínico

Se prepararon muestras de polen hasta obtener placas para Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR) y Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), se llevó a cabo en los Laboratorios de Paleoecología y Laboratorio de Microscopía Avanzada de la Universidad Nacional sede de Medellín. Los granos de polen fueron sometidos a acetólisis (10). Se elaboraron 48 placas permanentes. La caracterización se hizo siguiendo la nomenclatura internacional (11). De cada placa se midieron 25 granos de polen y de cada morfotipo se evaluaron 2 a 5 individuos, lo cual arrojó un total de 4800 datos. **Análisis estadístico.** Se realizaron pruebas estadísticas bajo la asesoría del grupo de investigación en estadística de UniQuindío, mediante los programas Spad versión 3.5 (Cisia-Ceresta 1998) para análisis de Componentes Principales y Statgraphics Centurion versión 2007 para los análisis de varianza - ANOVA.

Métodos para el análisis de la variación fenotípica del grano de polen. Para determinar si los caracteres del grano

son genéticos o adaptativos se efectuó un ANOVA dos niveles, las variables fueron ajustadas a un modelo lineal generalizado, éste se optimizó usando la regresión múltiple por etapas de tal manera que solo se incluyeron en el modelo aquellas variables que fueron significativas ($P < 0,05$). Se hizo un análisis de Repetibilidad para estimar el componente de varianza genética de cada una de las ocho variables estudiadas aportado a la varianza fenotípica total.

Métodos para el estudio anatómico

Se tomaron fragmentos de hojas y tallos adultos de 10 individuos vivos de cada uno de los ocho morfotipos y se colocaron en tubos Eppendorf que contenían 1.5 ml de solución fijadora de Glutaraldehído al 0,2 M en BP a pH 7,4. Las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad del Cauca, en donde fueron sometidas al protocolo para el análisis de las muestras por Microscopía Óptica de Alta Resolución (12). Los bloques se cortaron en Ultramicrotomo Ultracut Leica, se realizaron cortes de 1-2 micras, se tiñeron con Azul de Toluidina, se fijaron en porta y cubreobjetos mediante resina. Análisis estadísticos. Las matrices de datos fueron procesadas en Excell 2003 y con ellas se realizaron análisis de varianza, pruebas de rango múltiple y análisis discriminante. En total se analizaron 5760 datos.

Métodos para el estudio molecular

La Fase de laboratorio se realizó en la sección de Biología Molecular del Centro de Investigación en Agricultura Tropical-CIAT. Se utilizaron marcadores moleculares AFLP's, kit de Invitrogen. Se usó el protocolo para la extracción de ADN. Para probar la preamplificación se utilizaron tres individuos de la población y como control positivo se incluyeron tres individuos de especies diferentes de Fabaceae (*Cratylia argentea*, *C. mollis* Mart. ex Benth y *Dioclea virgata* (Rich.) Amshoff y una cuarta muestra de tomate (*Lycopersicum* sp.) tomada del kit de AFLP's. La prueba de preamplificación (PCR+1) obtenida dejó ver que las muestras de ADN de *Amaranthaceae* no estaban completamente limpias, por lo cual se les aplicó el protocolo del CIAT. La cuantificación de la concentración del ADN total se realizó mediante dos métodos diferentes: Por comparación visual con un patrón ya conocido y mediante la medición de la Absorbancia de cada una de las muestras.

Marcadores AFLP. Se utilizó un protocolo adaptado de los Kit AFLP de Invitrogen – AFLP Analysis System I y AFLP Starter Primer Kit. Se evaluaron 10 combinaciones de primers con el fin de seleccionar las dos que produjeran mayor número de bandas polimórficas: E-AAG/M-CAG, E-AAC/M-CAC, E-ACG/M-CTA, E-AGC/M-CAA, E-AGG/M-CAT, E-ACT/M-CTA, E-

ACC/M-CAC, E-ACG/M-CAG, E-AAC/M-CAG y E-AGG/M-CAG

Análisis estadístico. Para el análisis de polimorfismos, heterocigosidad y distancias genéticas se procedió así: Con las bandas visualizadas en los cuatro geles resultantes de las dos combinaciones se conformó en Excel (2003) una matriz binaria con un total de 15.912 datos. Para estimar el porcentaje de polimorfismo obtenido con cada combinación de cebadores se utilizó el método de estimación insesgada (14). También se determinó el porcentaje de polimorfismo obtenido dentro de cada población. La heterocigosidad promedio, entre y dentro de poblaciones, se estimó utilizando la raíz cuadrada de la frecuencia del genotipo recesivo y el método de estimación insesgada (15) y se asumió equilibrio Hardy - Weinberg.

Para generar la matriz de distancia entre pares de poblaciones se utilizó el coeficiente de apareamiento simple a partir de los datos de AFLP. Posteriormente, esta matriz, se procesó y se llevó a cabo el correspondiente análisis de varianza. Para establecer el nivel de significancia de los componentes de varianza se utilizó un procedimiento no paramétrico con 1000 permutaciones. También se calculó los valores ST, los cuales son análogos al estadístico F. El análisis de variabilidad genética entre y dentro de poblaciones, se llevó a cabo utilizando el coeficiente de similitud de Nei (14). El programa TFPGA permitió obtener

valores de similitud y construir el correspondiente dendrograma con el método de agrupamiento UPGMA. Adicionalmente, se realizó la prueba exacta de diferenciación poblacional. Se empleó la probabilidad combinada de Fisher (16). Se hicieron análisis relacionados con estadística descriptiva, el estadístico F. Se efectuó un análisis FENÉTICO con el programa NTSYSpc 2.02i (1998) y se obtuvo un fenograma mediante el índice de DICE y un análisis CLADÍSTICO bajo el criterio de máxima parsimonia con el programa PAUP Version 4.0b10. El método Bootstrap se efectuó con 100 réplicas. Los árboles obtenidos por los tres análisis fueron comparados.

Métodos para el estudio exomorfológico

Se evaluaron las 80 colecciones obtenidas en campo, además de unas 300 muestras de los herbarios COL, HUQ, PSO, CUVC y HUA. El trabajo se efectuó en el Herbario CUVC de la Universidad del Valle. Se hizo un examen detallado a nivel del tallo (siete caracteres), la hoja (36), la inflorescencia (12) y la flor (51 caracteres en las femeninas y 45 en las masculinas). Se aplicaron protocolos para el estudio de la arquitectura de la hoja (17), para el análisis de los tricomas (18), para las inflorescencias y para las flores se adaptó un protocolo específico. Para las tipificaciones y manejo nomenclatural se consiguieron los protólogos, tipos ó fototipos y

descripciones y se compararon con los resultados que arrojó el estudio de los morfotipos y se aplicó el Código de Vienna.

Análisis estadísticos. Se elaboraron dos matrices en Excel 2003. Una contenía datos multiestado y la otra reunía caracteres cuantitativos. En total 4226 datos se analizaron. Con la primera matriz se realizó un análisis cladístico con WINCLADA y NONA. Como grupo externo se usó a *Talinum paniculatum*, Portulacaceae. También se incluyó a *Iresine angustifolia*, *Rivina humilis* (Phytolaccaceae), *Amaranthus dubius* Mart., *Alternanthera lanceolata* (Benth.) Schinz y *Pfaffia iresinoides* (HBK) Spreng. Con la segunda matriz se efectuó un análisis discriminante mediante SPSS y un análisis de varianza. Finalmente, se combinaron y analizaron integralmente los resultados de los cuatro estudios y con base en ello se definió el tratamiento taxonómico y se elaboró una clave dicotómica.

RESULTADOS y DISCUSIÓN.

Resultados del estudio polínico

La caracterización morfométrica efectuada a los granos de polen de las especies *Iresine diffusa* e *I. herbstii*, realizada permitió establecer que en las dos especies se trata de granos con los siguientes caracteres (datos de las dos especies combinadas): forma esferoidal, tamaño pequeño y variable (en promedio 13 a 19 μm de diámetro),

unidad polínica tipo mónada, apolares, simetría radial; granos aberturado con número variable de aberturas (22 a 35), pantoporados, las aberturas son poros simples, membrana poral ornamentada con cuerpos de ectexina en forma de dientes o estructuras cónicas variables en número (2 a 20), nexina delgada con

0.2-0.7 μm de ancho, sexina de 1.4-1.9 μm de ancho con un tectum equinulado y perforado, ya que presenta una ornamentación compuesta por espínulas cónicas menores de 0.46 μm de longitud y perforaciones menores de 0.16 μm de diámetro, respectivamente (Figura 1).

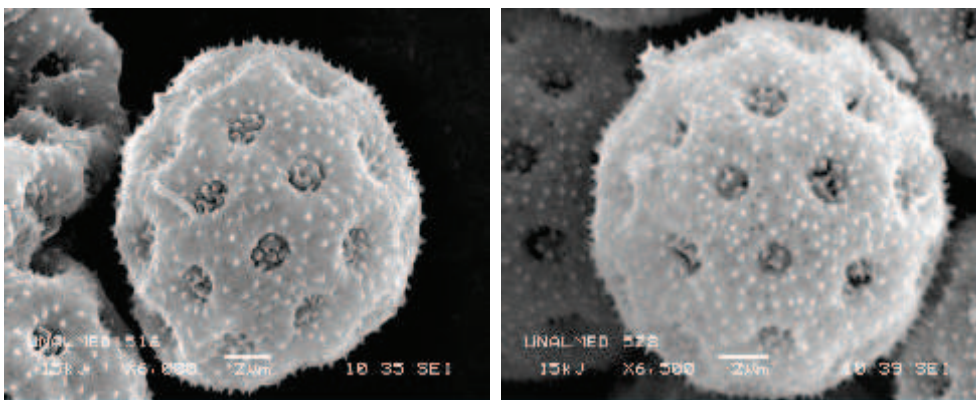


Figura 1. Granos de polen: A. *Iresine diffusa*. B. *I. herbstii* (Amaranthaceae)

Análisis de componentes principales. Los valores propios mostraron que los tres primeros componentes tienen un alto porcentaje acumulado de la varianza (77%); el 43.4% de la proporción de varianza explicada lo aporta el primer componente, el 21.2% el segundo y el 12.3% el tercero.

Análisis de varianza. Los resultados de los ANOVA establecen que *Iresine herbstii* tiene diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) con cuatro (a excepción de *triblanca*) de los cinco morfotipos evaluados de *I. diffusa*. A nivel intraespecífico sobre los

morfotipos de *I. diffusa* se interpreta que *bullafolia*, *minicaule* y *pachycaule* presentan diferencias a nivel de algunas variables con todos los demás. *Triblanca* muestra diferencias con *bullafolia*, *tribronce* y *minicaule* pero no con *pachycaule* y *tribronce*, mantiene diferencias significativas con *bullafolia*, *triblanca* y *minicaule*, pero no con *pachycaule*.

Análisis de la variación fenotípica del grano de polen. Los valores de varianza genética estimada con los datos crudos osciló entre 8,8 y 29,3%, mientras que con los datos ajustados al modelo, la estimación de la varianza

genética se incrementó oscilando entre 18,6 y 36%. Cuando se usaron los residuales, es decir, la variación no explicada por el modelo, la varianza genética osciló entre 2,5 y 90,9%. Esto significa que, las variables del grano de polen tienen un componente genético relativamente alto, lo cual les da gran valor adaptativo, puesto que tienen el potencial necesario para responder a los desafíos ambientales.

Resultados del estudio de anatomía foliar

Iresine diffusa e *I. herbstii* poseen los mismos tipos de tejidos (Figura 2A), a saber: la cutícula sobre la epidermis adaxial, el parénquima en empalizada, el parénquima lagunar con drusas (Figura 2B) y haces tipo Kranz (Figura 2C) y la epidermis abaxial con estomas (Figura 2D) y su respectiva cutícula, además de tricomas (Figura 2E).

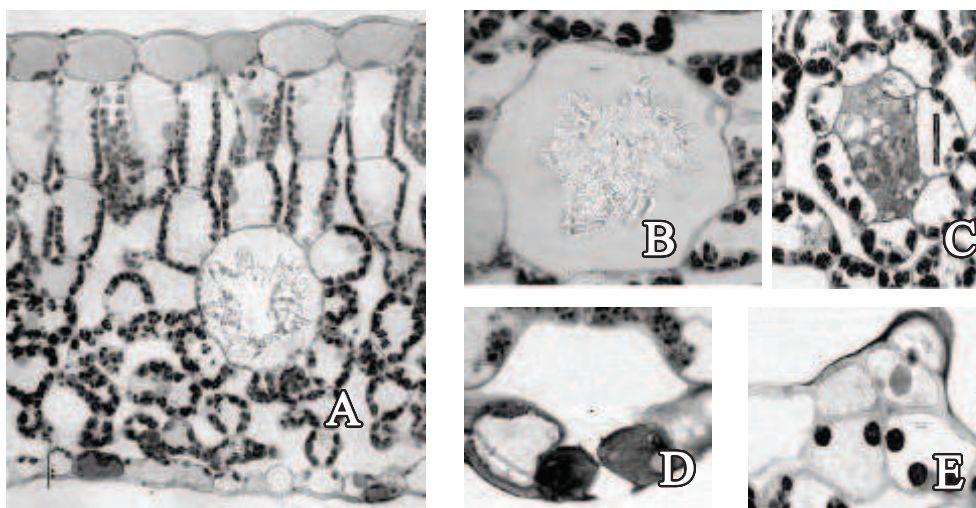


Figura 2. A. Estructura de la hoja de *Iresine herbstii* morfotipo *eliptifolia*, tomado de C.A. Agudelo 5078. B. Drusas del parénquima lagunar del minicaule, tomado de C.A. Agudelo 5115. C. Haces tipo kranz morfotipo *bullifolia*, tomado de C.A. Agudelo 5064. D. Estoma de *tribronce*, tomado de C.A. Agudelo 5099. E. Tricoma iniciando el estado de desarrollo. Escala de la barra 100 μ m.

Los valores propios del análisis discriminante mostraron que los dos primeros factores tienen un alto porcentaje acumulado de la varianza (77.8%). Las variables que más contribuyen a explicar las diferencias entre los morfotipos a nivel de las hojas y por ende la variación en los datos son:

ancho del tejido lagunar; ancho de las células en empalizada, longitud de las células de la epidermis superior; ancho de las células de la epidermis superior, aunque tienen una correlación del 74%; ancho de las células lagunares y longitud de las células de la vaina kranz. El ANOVA permitió establecer

que de las 15 variables analizadas, 11 (73.3%) presentan diferencias estadísticamente significativas entre los morfotipos a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ y sólo cuatro (26.7%) no. Estas últimas son: La longitud del tejido en empalizada, la longitud y el ancho del haz kranz y el ancho del tejido lagunar

La Prueba de rangos múltiples (prueba de Scheffé) permitió establecer grupos heterogéneos de morfotipos por variables, lo cual favoreció la identificación de caracteres diagnósticos. El **parénquima en empalizada** presentó dos tipos de organizaciones, una sola capa de células, como ocurre en la mayoría de morfotipos o dos capas amplias y relativamente cortas como en eliptifolia y variegata. El **parénquima lagunar** tiene una organización similar en las dos especies, en general, presenta células de forma variable (redondeadas, alargadas y amorfas), tamaño variable (grandes a pequeñas), con presencia de cloroplastos que en su interior llevan gránulos de almidón adheridos a la pared, es decir, en posición centrífuga.

Tanto las drusas como los haces Kranz están inmersos dentro del parénquima lagunar, no obstante, tienden a estar, ocupando una zona limítrofe entre éste y el parénquima en empalizada. Las **drusas** en todos los morfotipos, son de tamaño variable, se presume que están formadas por cristales de Oxalato de Calcio. **Los Haces vasculares tipo**

Kranz están presentes en las dos especies, su tamaño es variable, pero su constitución es similar, presentan una vaina de células parenquimáticas de forma variable (redondeadas, elipsoides, reniformes, amorfas), tamaño variable (grandes a pequeñas) y con cloroplastos (4-8 generalmente) en posición centrífuga. Las observaciones sobre el envés permitió identificar dos tipos de estomas, **anisocíticos y paracíticos**, clasificación que se basa en la forma de las células anexas (19).

Resultados del estudio de anatomía caulinar

El tallo de las dos especies está constituido por los siguientes tejidos básicos: La epidermis, colénquima, parénquima, esclerénquima, haces vasculares conformados por xilema, floema y cámbium, parénquima floemático y la médula (Figura 3). El **análisis discriminante** mostró que el primer factor involucra a 12 variables, todas (excepto una) con correlación positiva y de magnitud moderadamente alta. Con el **ANOVA** todas las variables relacionadas con el tallo e incluidas en el estudio (22) muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las medias de los morfotipos. **La Prueba de rangos múltiples** también permitió establecer diferencias entre grupos de morfotipos por variables.

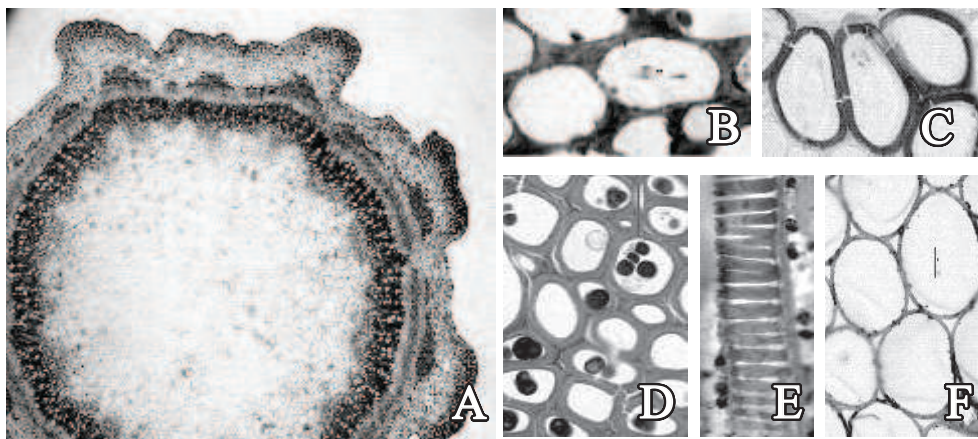


Figura 2. A. Estructura de la hoja de *Iresine herbstii* morfotipo eliptifolia, tomado de C.A. Agudelo 5078. B. Drusas del parénquima lagunar del minicaule, tomado de C.A. Agudelo 5115. C. Haces tipo kranz morfotipo bullafolia, tomado de C.A. Agudelo 5064. D. Estoma de tribronce, tomado de C.A. Agudelo 5099. E. Tricoma iniciando el estado de desarrollo. Escala de la barra 100 μm .

La **Epidermis** es uniestratificada, constituida por células cuadrangulares, rectangulares a ligeramente ovadas o redondeadas, las paredes son gruesas. pachycaule, fue el único morfotipo que presentó hasta nueve capas en la epidermis, mientras que los restantes solo exhibían una. El **colénquima** presenta células de forma y tamaño variables, las células pueden ser elipsoides, hexagonales, rectangulares o redondeadas, hay dos tipos: el angular y el anular. El **parénquima** en las dos especies está conformado por células redondeadas a elipsoides, presenta espacios intercelulares triangulares a romboides, además, posee abundantes gránulos de almidón individuales o en grupos en el interior de las células

Las células del esclerénquima tienen

una constitución similar en ambas especies de *Iresine*, son de tipo fibras extraxilares perivasculares, pero sí hay diferencias a nivel de las medias en el tamaño, las células son hexagonales a elipsoides o redondeadas, en ocasiones presentan gránulos de almidón en su interior. Los **Haces vasculares** son de tamaño variable, al igual que el número de capas de haces que constituyen los tallos, sin embargo, cinco morfotipos poseen cuatro ó menos capas y solo tres tienen como número máximo cinco ó hasta ocho capas. El xilema presenta células de formas variables, van desde rectangulares, hasta cuadradas o elipsoides, en sus tráqueas albergan amiloplastos y en ocasiones tílides. En el **xilema** se puede encontrar tanto protoxilema como metaxilema, además de tráqueas,

traqueidas y parénquima axial. El floema se ve claramente separado del xilema por el cámbium vascular, presenta tubos cribosos, células acompañantes y parenquima axial

Resultados del estudio molecular

Se logró extraer ADN para 82 muestras de Iresine y cuatro controles de forma satisfactoria, los cuales están almacenados en el CIAT. De 10 combinaciones de primers evaluadas se eligieron dos de las más polimórficas, en este caso la VI (E-ACT/M-CTA) y la VII (E-ACC/M-CAC). Los geles arrojaron patrones de bandas claramente discernibles.

Estadística: El porcentaje de loci

polimórficos fue de 27.45%. El análisis de **varianza molecular** (Tabla 1) permitió concluir que: 1. A nivel molecular es posible evidenciar la separación de la especie Iresine diffusa de I. herbstii ($\Phi_{st} = 0.68$). 2. Existe alta diferenciación entre poblaciones dentro de grupos (especies), con valores cercanos a los Phi reportados entre grupos (0.51), lo cual sugiere que los morfotipos dentro de las especies son unidades taxonómicas diferentes. 3. Existe alta diferenciación entre individuos dentro de poblaciones (0.36), lo que podría indicar que a nivel microgeográfico, subyacen otros grados de diferenciación no detectados en este estudio. 4. Para todos los casos los valores de Phi son altamente significativos $p = 0.0001$.

Tabla 1. Análisis de varianza molecular anidado de tres niveles para las especies y poblaciones de Iresine diffusa e I. herbstii (Amaranthaceae) mediante el programas AMOVA-PREP.

Fuente de Variación	gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Componentes de la Varianza	% Total	Estadístico PHI
Entre grupos	1	728.58	728.58	15.54	36.16	$\Phi_{st} = 0.687$
Entre poblaciones	6	881.14	146.85	14.01	32.59	
Dentro de población	70	940.80	13.44	13.44	31.25	$\Phi_{sc} = 0.510$
Total	77	2550.53				$\Phi_{ct} = 0.362$

La heterogeneidad de la Varianza medida por **Bartlett** produjo índices de heterocedasticidad (B_p) significativos a nivel de poblaciones dentro de especies ($B_p = 1.53112$; $P < 0.000999$) y a nivel de especies ($B_e = 3.15275$; $P < 0.000999$). La **Prueba Pareada de Bartlett** realizada entre parejas de poblaciones mostró de nuevo

diferencias significativas en las varianzas entre los individuos dentro de cada una de las parejas de poblaciones comparadas. El Valor del **estadístico (θ)** para todos los loci entre especies fue de $0,3536 \pm 0,0290$ y entre poblaciones de $0,6888 \pm 0,0165$. Estos valores fueron altamente significativos (408 gl , $X^2 = 2272.47$, $P < 0,00001$). **La**

prueba exacta de diferenciación poblacional (Raymond & Rousset 1995) para todos los loci con 408 gl produjo una $X^2=3075.45$, que en general determina una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0000$), indicando que existe clara diferencia genética entre las poblaciones estudiadas sin considerar la separación en las dos especies.

Mediante el análisis simultáneo de todas las poblaciones con la **prueba exacta de diferenciación poblacional** se extrajeron 94 loci diagnósticos (46%) de los 204 analizados y con ellos se creó un **código de barras** para cada especie. Todos los valores de **PhiST** son significativos ($P<0,0001$). Los valores de **distancia genética** entre pares de poblaciones muestran que en general las distancias son altas entre las poblaciones de *Iresine diffusa*, ya que oscilan entre 0.35-0.66, mientras que son moderadamente altas entre las poblaciones de *I. herbstii*, que varían entre 0.15-0.36. Los **agrupamientos UPGMA** por la mínima distancia insesgada (14) arrojaron resultados congruentes. Los resultados se discutieron con trabajos recientes (20, 21, 22).

Resultados del estudio exomorfológico

Se realizó una caracterización morfológica detallada para cada una de las especies. Se identificó un solo tipo básico de tricomas (pluricelulares, simples, largos, delgados y uniseriados), pero puede presentar tres

variantes. Se construyeron mapas con la distribución geográfica. Con el **análisis discriminante** se obtuvo valores propios que permitieron seleccionar a los dos primeros factores ya que tienen un alto porcentaje acumulado de la varianza (77.02%). Las correlaciones fueron directas, positivas y de magnitud alta entre el diámetro máximo del tallo y el diámetro mínimo (0,75); igual ocurre entre el diámetro máximo del tallo y el ancho de la lámina (0,71); el diámetro mínimo del tallo y el ancho de la lámina; también entre la longitud de la lámina con el ancho de la misma (0,89); con la longitud del pecíolo (0,79) y con el número de pares de venas (0,85). Similarmente ocurre entre el ancho de la lámina con el número de pares de venas.

Estadística: El **ANOVA** muestra diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los morfotipos a un nivel alfa de 0.05. La **Prueba de rangos múltiples** permitió determinar grupos heterogéneos con las diferentes variables analizadas. La **Matriz de confusión** permitió establecer que el porcentaje de acierto de asignación de los individuos de la muestra a los grupos conformados por el análisis discriminante era muy alto (mayor del 80%). Los **agrupamientos** del análisis discriminante fueron congruentes con los efectuados con otros caracteres. El análisis cladístico arrojó un árbol parsimonioso con 192 pasos, un índice de consistencia (CI)= 0.66 y un índice de Retención (RI) =

0.55 (Figura 7). El Bootstrap brinda bajo soporte al género.

Combinación de resultados. Al combinar todos los resultados alcanzados se logró consolidar las siguientes **propuestas taxonómicas**: 1. Mantener como especies separadas e independientes a *Iresine diffusa* e *Iresine herbstii*. 2. Los morfotipos eliptifolia y variegata se mantienen agrupados bajo una sola entidad taxonómica denominada *I. herbstii* Hook. 3. El morfotipo retusa que hacía parte de *I. herbstii* se constituye en una especie nueva, la cual se denominó *Iresine retusifolia* y 4. Los cinco morfotipos de *I. diffusa* se separan en varias entidades taxonómicas, así: El morfotipo tribronce permite recobrar el estatus de especie a *I. spiculigera*. El morfotipo triblanca permite conservar el nombre de *I. diffusa*. Los morfotipos minicaule, bullafolia y pachycaule se constituyeron en especies nuevas, por lo cual se denominaron *I. minicaulis*, *I. bullata* e *I. pachycaulis* respectivamente. Finalmente se elaboró una **clave dicotómica** con caracteres de polen, anatomía y morfología.

Publicaciones científicas. Se han realizado tres publicaciones, se presentaron cuatro ponencias, una de ellas en el congreso Latinoamericano de Botánica en República Dominicana. En la actualidad están en trámite cuatro publicaciones específicas para las revistas: Grana, American Journal of Botany, Systematic Botany y Novon.

Conclusiones y principales resultados nuevos alcanzados: Se logró resolver las dificultades taxonómicas del complejo, el género *Iresine* resultó monofilético, mientras que *I. diffusa* e *I. herbstii* son parafiléticas, las variables del grano de polen tienen un componente genético relativamente alto, se identifica por primera vez para la ciencia que los dos complejos presentan estomas anisocíticos y paracíticos de forma simultánea en sus hojas, se redujeron los vacíos en el conocimiento sobre los caracteres del polen, anatomía, morfología y molecular de especies de Amaranthaceae, por la composición que alcanza *Iresine* en Colombia, once especies, este país tiene la mayor diversidad de especies del género en el mundo y el complejo *I. diffusa* s.l. se encuentra en un proceso más avanzado de evolución molecular, mientras que es más temprano en *I. herbstii*s.l.

BIBLIOGRAFÍA

1. Eliasson, U.H. 1987. Amaranthaceae. In: G. Harling & Andersson (eds.). *Flora of Ecuador* 28:1-138.
2. Townsend, C.C. 1974. Amaranthaceae. P. 1-49. In E. Nasir & A. I. Ali (eds); *Flora of West Pakistan Bulletin* 71. Royal Botanical Garden Kew.
3. Standley, P. C. 1937a. Amaranthaceae. In: Fl. of Perú, Field Mus. Nat. Hist., Bot. Ser. 13(2):478-518.
4. Smith, L. B. & R. J. Downs 1972.

- Amarantáceas. En: Fl. Illustr. Catarinense 1:1-110.
5. Agudelo H, C.A. 2008. Amaranthaceae. Flora de Colombia No. 23. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. Colombia. 138 p.
 6. Agudelo-Henao, C.A. 2008. Amaranthaceae. In: *Nuevo Catálogo de la Flora Vascular de Venezuela* (Hokche, O., P.E. Berry & O. Huber, eds.), pp. 10-14. Fundación Instituto Botánico de Venezuela. Caracas.
 7. Shinnars, L.I. H. 1962. Illegitimacy of the names *Iresine Celosia* L., *I. celosoides* L., and *I. paniculata* (L.) Kuntze (Amaranthaceae). *Taxon* 11(4):141-142.
 8. Duke, J. A. 1961. Amaranthaceae. In: R. E. Woodson, Jr., *et al.*, (eds.). *Fl. Pan. Ann. Missouri* (9) (9)
 9. Agudelo H., C. A. 1996. Importancia Económica y Etnobotánica de Amaranthaceae en Colombia. *Revista Facultad de Formación Avanzada e Investigaciones*. 6:45-74.
 10. Erdtman, G. 1952. *Pollen morphology and plant taxonomy*. Reprint 1986. – E.J. Brill, Leiden.
 11. Punt, W., S. Blackmore, S. Nilsson & A. Le Thomas, 1994. *Glossary of Pollen and Spore Terminology*. LPP Contribution Series No. 1., LPP Foundation, Utrecht.
 12. Gonzáles-Santander, R. 1968. *Técnicas de microscopía Electrónica en Biología*. Ed. Aguilar. Madrid, 666 p.
 13. Mc Couch, S.R., G. Kochert., Z.H. Yu., Z.Y. Wang, G.S. Khush, W.R. Coffman & S.D. Tanksley. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 815-829.
 14. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
 15. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106:283-292.
 16. Fisher, R.A. 1954. Population genetics. *Proceedings of the Royal Society B*. 141:510-523.
 17. Hickey, L.J. 1973. A revised classification of the architecture of Dicotyledonous leaves. En: Metcalfe and Chalk (editors), *Anatomy of the dicotyledons*, 2a ed., vol. 1 Oxford *Science*: 25-39.
 18. Theobald, W.L., J.L. Krahulik & R.C. Rollins. 1979. Trichome description and classification. Pp. 40-53. In: C. R. Metcalfe & L. Chalk (eds.). *Anatomy of the Dicotyledons - Systematic anatomy of the leaf and stem*. v.I. 2 ed. London, Oxford University Press.
 19. Paniagua R., G.A, M.N. Martín de Serrano, M.d.P. Sesma E., M. Alvarez, R. Anadón, B. Fraile, F.J. Saez, M.P. del Miguel G. 1997. *Citología e Histología vegetal y animal*. Ed. McGraw-Hill-Interamericana, España, 924 pp.
 20. Borsch, T. 1998. Pollen types in the Amaranthaceae. Morphology and evolutionary significance. *Grana*

- 37:129-142.
21. Judd, W.S., C.S. Campbell, E.A. Kellogg, P.F. Stevens, M.J. Donoghue. 2008. *Plant systematics – A phylogenetic approach*, 3 edn. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 460 p.
 22. Müller, K. & T. Borsch. 2005. Phylogenetics of Amaranthaceae based on matK/trnK sequences data – evidence from parsimony, likelihood, and Bayesian analyses. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 92:96-102.

AGRADECIMIENTOS

A las siguientes instituciones: Universidad del Quindío, Centro de Investigación en Biodiversidad-CIBUQ; Universidad del Valle; Universidad Nacional sede Medellín y a sus Laboratorios de Paleoecología de la Escuela de Biociencias y de Microscopía Avanzada de la Facultad de Minas; Universidad del Cauca, Laboratorio de Microscopía Electrónica y al Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT, Laboratorio de Biología Molecular, Palmira. También a la POLICIA NACIONAL, seccional Cundinamarca. A los herbarios que prestaron material botánico: CAUP, Universidad del Cauca; COL, U. Nacional, Instituto de Ciencias Naturales; CUVC, Universidad del Valle; HUA, Universidad de Antioquia; HUQ, U. del Quindío y PSO, Universidad de Nariño. Igualmente, para las siguientes personas: Philip A. Silverstone Sopkin

(Director tesis), Heiber Cárdenas Henao (asesor), Iván Andrés González (asesor), Enrique Javier Peña y Guillermo Barreto profesores Universidad del Valle; César Augusto Velásquez R. (asesor), profesor U. Nacional, Medellín; Gerardo Gallego S. (asesor), Coordinador Laboratorio de Biología Molecular, CIAT, Palmira; Michael Nee, New York Botanical Garden, U.S.A.; Gerardo Andrés Torres, Director Laboratorio de Microscopía Electrónica, Universidad del Cauca; Ana Lucía López G., Directora Centro de Investigación en Biodiversidad-CIBUQ, Universidad del Quindío; Wilton Valencia, Estudiante Departamento de Biología, Universidad del Valle; Harold G. Suárez, Bio., Investigador CIAT, Palmira; María Esther Cardona, Bio., Técnico Herbario CUVC, Universidad del Valle; Medardo A. Pérez Guisa, Coordinador Laboratorio de Microscopía Avanzada, Facultad de Minas, Universidad Nacional, Medellín; Lyda Patricia Mosquera, Bio., Técnico Lab. Microscopía Electrónica, UniCauca; Carlos A. Monsalve, profesor Universidad Nacional Medellín; Diego Macías Pinto, M. Sc., profesor Universidad del Cauca, Popayán; Manuel Castrillón Fernández, Ing. Físico, Universidad del Cauca; Carola Lara Jiménez, Bio. y Aida Elena Baca, Bio., Universidad de Nariño; Germán Darío Gómez Marín, M.Sc.; Carlos Alonso Maya Lastra, Lic. Bio. y Roberto Palchucán España, Lic. Bio., Universidad del Quindío.