

## TAMAÑO DEL GENOMA Y CARIOTIPO EN *Agave angustifolia* Y *A. rhodacantha* DE SONORA, MÉXICO

### NUCLEAR GENOME SIZE AND KARYOTYPE OF *Agave angustifolia* AND *A. rhodacantha* FROM SONORA, MÉXICO

Sergio Francisco Moreno-Salazar<sup>1,2</sup>, Martín Esqueda<sup>1</sup>, Javier Martínez<sup>3</sup> y Guadalupe Palomino<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apdo. Postal 1735, 83000, Hermosillo, Sonora, México. <sup>2</sup>Universidad de Sonora. Rosales y Niños Héroe, 83000, Hermosillo, Sonora, México. <sup>3</sup>Laboratorio de Citogenética, Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, México, D. F. Tel. 01 (55) 5622-9045, Fax 01 (55) 5622-9046.

\* Autor para correspondencia (palomino@ibiologia.unam.mx)

#### RESUMEN

El contenido de ADN nuclear en tejido foliar de tres poblaciones silvestres de *Agave angustifolia* y dos de *Agave rhodacantha* del municipio de Nácori Chico, Sonora, México, se determinó mediante citometría de flujo. Todos los especímenes en las dos especies fueron diploides ( $2n = 2x = 60$ ). El contenido promedio 2C-ADN nuclear fue de 8.499 pg (1Cx = 4165 Mpb) en *A. angustifolia* y de 8.415 pg (1Cx = 4124 Mpb) en *A. rhodacantha*. El contenido promedio 2C-ADN de las tres poblaciones de *A. angustifolia* y una de *A. rhodacantha* (El Bajío) fueron iguales, pero estadísticamente diferentes de la población de Los Mochomos de *A. rhodacantha*. Los cariotipos de las poblaciones de *A. angustifolia* de Los Mochomos y El Chorro, mostraron el mismo citotipo (48m + 2sm + 6st + 4t), el cual fue diferente en El Bajío (42m + 4sm + 10st + 4t). Las dos poblaciones de *A. rhodacantha* tuvieron el mismo cariotipo (40m + 6sm + 4st + 10t). La longitud total del genoma (LTG) y el índice de asimetría (TF %) variaron significativamente entre las poblaciones de las dos especies de agave, con excepción de LTG entre las poblaciones de *A. rhodacantha*. Los valores de LTG fueron mayores en *A. rhodacantha* que en *A. angustifolia* y en TF % ocurrió lo contrario. Estos resultados se consideran básicos para el desarrollo de estrategias biotecnológicas y mejoramiento genético de estas especies.

**Palabras clave:** *Agave angustifolia*, *A. rhodacantha*, citometría de flujo, contenido de ADN nuclear, cariotipo, citotipo.

#### SUMMARY

The nuclear DNA content of leaf tissue from three wild populations of *Agave angustifolia* and two of *Agave rhodacantha* from Nácori Chico county in Sonora state, was determined by flow cytometry. All specimens studied in both species were diploids ( $2n = 2x = 60$ ). The mean 2C nuclear DNA content was 8.499 pg (1Cx = 4165 Mbp) in *A. angustifolia*, and 8.415 pg (1Cx = 4124 Mbp) in *A. rhodacantha*. The mean 2C-DNA content among the three populations of *A. angustifolia* and one of *A. rhodacantha* (El Bajío) were the same, although statistically different from Los Mochomos population of *A. rhodacantha*. Plant karyotypes of two populations of *A. angustifolia* from Los Mo-

chomos and El Chorro, showed the same cytotype (48m + 2 sm + 6st + 4t), which was different in El Bajío (42m + 4sm + 10st + 4t). The two populations of *A. rhodacantha* showed the same karyotype (40m + 6sm + 4st + 10t). The total genome length (LTG) and asymmetry index (TF %) varied significantly among populations of both species, except LTG among *A. rhodacantha* populations. LTG values were larger in *A. rhodacantha* as compared to *A. angustifolia*, while the contrary occurred with TF %. These results are considered basic information to develop biotechnological and breeding approaches for both species.

**Index words:** *Agave angustifolia*, *A. rhodacantha*, flow cytometry, nuclear DNA content, karyotype, cytotype.

#### INTRODUCCIÓN

El género *Agave* está conformado por 200 especies y 47 categorías infraespecíficas, de las cuales 186 taxones se distribuyen en la República Mexicana (García-Mendoza, 2002). En Sonora se encuentran 26 especies, 4 subespecies y 4 variedades nativas de *Agave* (Gentry, 1982). Dentro de esta diversidad destaca *A. angustifolia* Haw., utilizada durante siglos en la elaboración de “bacanora”, bebida alcohólica tradicional de Sonora, cuya manufactura actualmente representa una alternativa económica de alto potencial para las comunidades serranas. Esta especie es la única reconocida en la Denominación de Origen del Bacanora. Sin embargo, como la materia prima es de origen silvestre, existe poca claridad y control de las variantes genotípicas y fenotípicas utilizadas, o aún más, si el material empleado por los productores de la bebida es un taxón único. En estudios de campo realizados por los autores del presente trabajo, recientemente se observó el uso de *A. rhodacantha* Trel. en Nácori Chico, Sonora. Según Gentry (1982), esta última tiene una distribución restringida hacia el sur de

Sonora, mientras que *A. angustifolia* crece en un área más amplia desde el sur hasta el noroeste, e incluye parte de la sierra alta del estado (noreste). De lo anterior se desprende la necesidad de hacer un inventario para actualizar el conocimiento sobre la diversidad y distribución de agaves en Sonora, así como una evaluación de la variabilidad presente en estos recursos fitogenéticos, con fines de conservación, mejoramiento y aprovechamiento más eficiente.

La diversidad genética puede medirse mediante la variación en la secuencia y número de nucleótidos del ADN, la cantidad o el tamaño del ADN nuclear y el número y estructura de los cromosomas. Numerosas investigaciones han demostrado que la variación en el tamaño del genoma tiene significado adaptativo e influye sobre el fenotipo de dos formas, en la expresión de su contenido génico y en los efectos físicos de su masa o volumen (Bennett y Leitch, 1995; Arumuganathan *et al.*, 1999; Bonos *et al.*, 2002). El término nucleotipo se emplea para definir aquellos aspectos del ADN nuclear que afectan el fenotipo, independientemente de la información codificada contenida en los genes. El contenido de ADN de una especie vegetal se refiere a la cuantificación del tamaño del genoma en pg, su composición en millones de pares de bases de nucleótidos (Mpb) y la detección de poliploides. El valor  $1Cx$  corresponde al contenido de ADN en Mpb del genoma con número cromosómico  $x$  (Greilhuber *et al.*, 2005) y es útil para hacer comparaciones en especies poliploides de *Agave*. El uso de la información relativa al tamaño del genoma es muy variada e incluye diversos campos de interés como la biología molecular y celular, ecología, fitogeografía y sistemática. Algunas comparaciones en la cantidad de ADN nuclear han sido útiles en estudios citotaxonómicos y evolutivos (Bonos *et al.*, 2002).

Las especies de *Agave* presentan cariotipos bimodales formados de un grupo de cinco pares de cromosomas grandes y 25 pequeños, en los cuales se ha llevado a cabo un proceso de evolución natural llamado "orto-selección". Éste consiste en la amplificación de regiones de ADN que no codifican genes, en sitios distribuidos entre las regiones de entrecruzamiento en los cromosomas del complemento. Este proceso da como resultado un número básico ( $x$ ) uniforme y cariotipos en los que se mantiene el grupo de cromosomas grandes y pequeños (Brandham y Doherty, 1998). Castorena-Sánchez *et al.* (1991), al analizar el cariotipo de cinco taxones diploides y poliploides de *Agave*, observaron que, independientemente de la poliploidía, se mantienen los cariotipos bimodales, y plantean que el proceso de especiación en *Agave* se debió a rearrreglos estructurales y a mutaciones puntuales en el grupo de cromosomas pequeños del complemento.

Se han realizado estudios sobre el contenido de ADN nuclear en diferentes especies de *Agave* (Banerjee y Sharma, 1987; Cavallini *et al.*, 1996; Zonneveld, 2003; Palomino *et al.*, 2003, 2005), como un criterio para conocer sus relaciones filogenéticas o para detectar niveles de variabilidad inter e intraespecífica. El género *Agave* tiene un número cromosómico básico  $x = 30$ ; este valor se ha confirmado a través de la observación de 30 bivalentes en metafase 1 de la meiosis, en varios taxones de maguey (Brandham, 1969; Pinkava y Baker, 1985; Ruvalcava-Ruiz y Rodríguez-Garay, 2002). El valor de  $x = 30$  del género *Agave* podría considerarse alto y corresponder a un paleopoliploide, un poliploide secundario, o haberse originado de un poliploide intragenérico (Pinkava y Baker, 1985).

Las especies de *Agave* muestran varios niveles de ploidía, desde diploides ( $2x$ ) hasta octoploides ( $8x$ ) y el contenido  $2C$  de ADN nuclear en plantas diploides es de 8 pg aproximadamente. Palomino *et al.* (2003) determinaron mediante citometría de flujo el tamaño del ADN genómico en ocho variedades de *A. tequilana* Weber, y encontraron una relación específica entre el nivel de ploidía y el contenido de ADN. Posteriormente, al estudiar el tamaño del genoma de dos poblaciones de *A. angustifolia* de Oaxaca, Palomino *et al.* (2005) observaron una población diploide ( $2n = 2x = 60$ ) y otra triploide ( $2n = 3x = 90$ ), con diferencias en la proporción y tipos de cromosomas en sus cariotipos, con lo cual corroboraron la presencia de citotipos poliploides estructurales en *A. angustifolia*; estos autores observaron también diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) entre el tamaño del genoma de los dos citotipos.

Recientemente, Barraza-Morales *et al.* (2006) estudiaron la variabilidad genética de *A. angustifolia* mediante AFLP, en tres municipios de la sierra de Sonora: Bacanora, Bacadéhuachi y Nácori Chico. Los índices de similitud inter e intrapoblacionales oscilaron de 0.749 a 0.786 y de 0.800 a 0.827, respectivamente. La mayor distancia genética (0.106 y 0.093) se encontró en la población de Nácori Chico donde la variabilidad promedio intrapoblacional fue de 0.26. Estos resultados permitieron definir el área de muestreo del presente estudio.

La variabilidad morfológica y genética encontrada en *A. angustifolia* y *A. rhodacantha*, favorecen la posibilidad de seleccionar en estas poblaciones silvestres de maguey, biotipos élite con características útiles que puedan emplearse en programas de mejoramiento genético y biotecnología. En este estudio se utilizó la citometría de flujo y el análisis de los cromosomas para cuantificar la variación inter e intraespecífica en el tamaño del genoma, su composición de nucleótidos (Mpb), el nivel de ploidía y la estructura de los cariotipos de tres poblaciones silvestres de *A.*

*angustifolia* y dos de *A. rhodacantha* localizadas en Nácori Chico, Sonora.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y sitios de muestreo

Los especímenes estudiados provienen de tres poblaciones silvestres de *A. angustifolia*: El Bajío (29°47'28" LN, 109°00'28" LO), Los Mochomos (29°55'58" LN, 108°60'04" LO), y El Chorro (29°42'45" LN, 109°08'21" LO), y dos poblaciones de *A. rhodacantha* (colectadas en El Bajío y Los Mochomos), localizadas en el municipio de Nácori Chico, Sonora. Las áreas de estudio presentan un clima semiseco semicálido, una altitud de 900 a 1600 m, pendientes de 2 a 17 grados, en mesetas y pequeños lomeríos; los agaves están asociados principalmente con plantas arbóreas y arbustivas que componen el matorral subtropical. Los suelos contienen niveles pobres de fósforo, nitrógeno y materia orgánica. Las especies de agave crecen de forma simpátrica; el mecanismo aislante probablemente sea más de tipo genético que ecológico, ya que los microambientes tienen poca variación. La distribución parece dirigida hacia una reducción en la competencia y reforzamiento en la segregación genética.

### Tamaño de muestra

Con base en el método de cuadrantes al azar, en cada sitio se trazaron tres áreas de 50 x 100 m (5000 m<sup>2</sup>), se contaron los agaves para estimar su población total y el número de éstos en fase adulta (altura ≥ 1 m). Se determinó un tamaño de muestra representativo, con 10 % del total de individuos adultos. Con estas consideraciones se colectaron 10 hijuelos en cada sitio. Para el análisis cromosómico se utilizaron de 2 a 5 individuos por población.

### Determinación del tamaño de genoma y nivel de ploidía

La determinación del tamaño de genoma, nivel de ploidía y análisis de los cromosomas se realizaron en el Laboratorio de Citogenética, Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se analizaron en núcleos aislados de la parte basal interna de la hoja central, proveniente de cada uno de los 50 hijuelos colectados. En todos los casos las determinaciones se hicieron por triplicado, con plantas de maíz (*Zea mays* cv. CE-777) como referencia (2C-ADN = 5.433 pg) (Dolezel *et al.*, 1998). Se cuantificó el 2C-ADN en picogramos (pg), su composición (1Cx) (Mpb) y el nivel de ploidía por citometría de flujo (CF). Se empleó un equipo Partec CA II (Partec GBMH) previamente alineado con núcleos de

eritrocitos de pollo (Palomino *et al.*, 2003). La potencia del CF se ajustó para que el histograma de los núcleos del maíz, apareciera en el canal 50 de la pantalla del aparato, a fin de asegurar las condiciones óptimas del equipo.

La extracción de los núcleos de las plantas se llevó a cabo de acuerdo con la metodología propuesta por Otto (1990), y las modificaciones sugeridas por Dolezel y Göhde (1995). En una caja Petri de 11 cm de diámetro, que contenía 1 mL de la solución de Otto-1 (ácido cítrico 0.1 M y 0.5 % de Tween 20<sup>®</sup>), se colocaron de 70 a 100 mg de tejido foliar de *A. angustifolia* o de *A. rhodacantha* y de 20 a 25 mg de *Zea mays*. El material se picó finamente con una navaja de rasurar y se filtró a través de una malla de nilón de 50 µm para separar la suspensión de núcleos del material grueso. La suspensión de núcleos se incubó por 10 min a temperatura ambiente; después se centrifugó a 90 g por 3 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 mL de la solución de Otto-1, para volver a centrifugarse en las condiciones ya descritas. Nuevamente se eliminó el sobrenadante y los núcleos se resuspendieron en 0.5 mL de Otto-1, se adicionaron 2 mL de la solución de Otto-2 (0.4 M de Na<sub>2</sub>HSO<sub>4</sub>) y se agregaron enseguida 125 µL de ARNasa e igual cantidad de yoduro de propidio, para su análisis inmediato en el CF.

En cada muestra se analizaron al menos 10000 núcleos. Las medias y los coeficientes de variación (CV) de los histogramas generados por el CF, se calcularon con el programa DPAC (Partec GMBH). Para la validación de las repeticiones, el CV de cada histograma fue menor de 5 % (Dolezel, 1997). El tamaño del genoma se calculó mediante la fórmula:

$$2C \text{ ADN de Agave} = \frac{\text{Media histograma } G_0 / G_1 \text{ de Agave}}{\text{Media histograma } G_0 / G_1 \text{ planta de referencia}} \times 2C \text{ ADN planta de referencia (pg)}$$

La composición de nucleótidos (1Cx) de los genomas se obtuvo con la siguiente relación: 1 pg de ADN = 980 Mpb (Bennett *et al.*, 2000).

### Conteo y análisis de cromosomas mitóticos

La observación y clasificación de los cromosomas se hizo de acuerdo con la metodología propuesta por Palomino *et al.* (2005). Para corroborar el nivel de ploidía se cuantificó el número de cromosomas a partir de células meristemáticas de raíces en metafase mitótica, recolectadas entre las 7:00 y 8:00 am. Las raíces se lavaron con agua corriente y se depositaron en una solución mitostática de 8-hidroxiquinoleína 0.002 M y se mantuvieron en ella, en oscuridad, por 6 h a 18 °C. Los ápices radicales se fijaron

por 24 h en reactivo de Farmer (alcohol etílico 96 % y ácido acético glacial, 3:1 v/v). Después de la fijación las raíces se hidrolizaron en una solución de HCl 1 N a 60 °C, durante 15 min. Posteriormente los cromosomas se tiñeron con el reactivo de Schiff (Feulgen) durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad.

Las células mitóticas se observaron al microscopio óptico, en un segmento de meristemo de aproximadamente 0.5 mm colocado sobre un portaobjetos, se le añadió una gota de propiono-orceína 1.8 % y se le colocó el cubreobjetos; posteriormente se golpeó suavemente, con la punta de unas pinzas, hasta esparcir el tejido. Cuando se observaron células en metafase mitótica, se procedió a dejarlas en un solo plano (horizontal), mediante presión sobre el cubreobjetos. Las laminillas se hicieron permanentes con el método del hielo seco, se deshidrataron en alcohol etílico (96 %) y se montaron en bálsamo de Canadá. Una vez obtenida la preparación se seleccionó, fotografió y cuantificó el número de cromosomas, seleccionando exclusivamente las células donde los cromosomas se observaron con buena tinción, bien separados y en un solo plano. Estos criterios estrictos de selección aunado a problemas de enraizamiento de los hijuelos, limitaron el tamaño de la muestra. Se estudiaron 11 individuos de *A. angustifolia*: El Bajío (4), Los Mochomos (2) y El Chorro (5), y ocho de *A. rhodacantha*: El Bajío (4) y Los Mochomos (4), y se analizaron de 1 a 2 células por organismo. Las fotomicrografías se obtuvieron en un fotomicroscopio Carl Zeiss tipo II, con el objetivo 100 x y un optobar de 1.25  $\mu\text{m}$ .

#### Medición, clasificación de cromosomas y elaboración de idiogramas

La medición y clasificación de cromosomas se hizo según los criterios de Levan *et al.* (1964). La medición de la longitud total, de brazos cortos y largos de cada cromosoma, se hizo directamente en las fotografías; se obtuvieron los valores promedio de cinco células por población y se elaboró el idiograma correspondiente, y los cromosomas se ordenaron en parejas de homólogos, en forma decreciente y de acuerdo con la posición del centrómero. También se estableció la longitud total del genoma (LTG) y el índice de asimetría TF % (Gupta y Gupta, 1978), a través de la fórmula:

$$\text{TF}\% = \frac{\text{Longitud total de los brazos cortos de los cromosomas}}{\text{Longitud total de los cromosomas}} \times 100$$

#### Análisis estadístico

Se hizo un análisis de varianza (ANOVA) bajo un diseño anidado desbalanceado para evaluar la significancia estadística entre los valores promedio del tamaño del genoma

(pg), en las diferentes poblaciones de *Agave* estudiadas. Se evaluaron las dos especies como primer nivel, las poblaciones o sitios de colecta anidadas dentro de las especies y las plantas dentro de los sitios. Un diseño similar se empleó para evaluar las diferencias entre los valores de la LTG y el TF % del complemento cromosómico total de las plantas. Para la realización de estos análisis se utilizó el programa NCSS versión 2001 (Hintze, 2001).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Variación en el tamaño de ADN genómico y nivel de ploidía

La Figura 1 muestra los histogramas característicos obtenidos en el análisis del contenido nuclear de ADN en las plantas de *Agave angustifolia* y *Agave rhodacantha* provenientes de El Bajío. El histograma ajustado en el canal 50, representa el contenido 2C-ADN de los núcleos de maíz en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>; el de menor tamaño que aparece en el canal 100, indica los núcleos de maíz en la fase G<sub>2</sub>, con un contenido 4C-ADN. Todos los histogramas comprendidos entre los canales 77 y 84, corresponden a núcleos de *A. angustifolia* o *A. rhodacantha* diploides, en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. En todas las muestras, la cantidad de núcleos de *Agave* spp. en fase G<sub>2</sub> (canales 154 a 168) fueron escasos. Similarmen-te, Palomino *et al.* (2003) no observaron núcleos con un contenido mayor a 4C-ADN, en *A. tequilana*, lo cual indica la ausencia de endopoliploidía.

Todas las plantas colectadas en los tres sitios fueron diploides (2n = 2x = 60). En promedio, el contenido de ADN nuclear y la composición del genoma fue igual en *A. angustifolia* (2C-ADN = 8.499 pg y 1Cx = 4165) que en *A. rhodacantha* (2C-ADN = 8.415 pg y 1Cx = 4124), ya que el análisis estadístico reveló que no hubo diferencias significativas. Sin embargo, aunque *A. angustifolia*, no varió entre localidades, sí se encontró diferencia entre las dos poblaciones de *A. rhodacantha*. La población de *A. rhodacantha* de Los Mochomos tuvo valores menores (P < 0.05) en estos parámetros: 2C-ADN = 8.326 pg y 1Cx = 4080 (Cuadro 1).

De los 247 taxones de *Agave* se ha analizado el tamaño del genoma en 26, y son diploides la mayoría de ellos. En todos estos estudios se ha observado variación en la cantidad de 2C-ADN, desde 6.0 pg en *A. fourcroydes* Lem. hasta 9.6 pg en *A. deserti* Engelm. (Palomino *et al.*, 2005). Los promedios obtenidos en el contenido de 2C-ADN y el tamaño del genoma 1Cx, concuerdan con lo registrado para una población diploide de *A. angustifolia* de Oaxaca, México, cuyos valores promedio fueron de 8.477 pg y 4139 Mpb para 2C-ADN y 1Cx, respectivamente

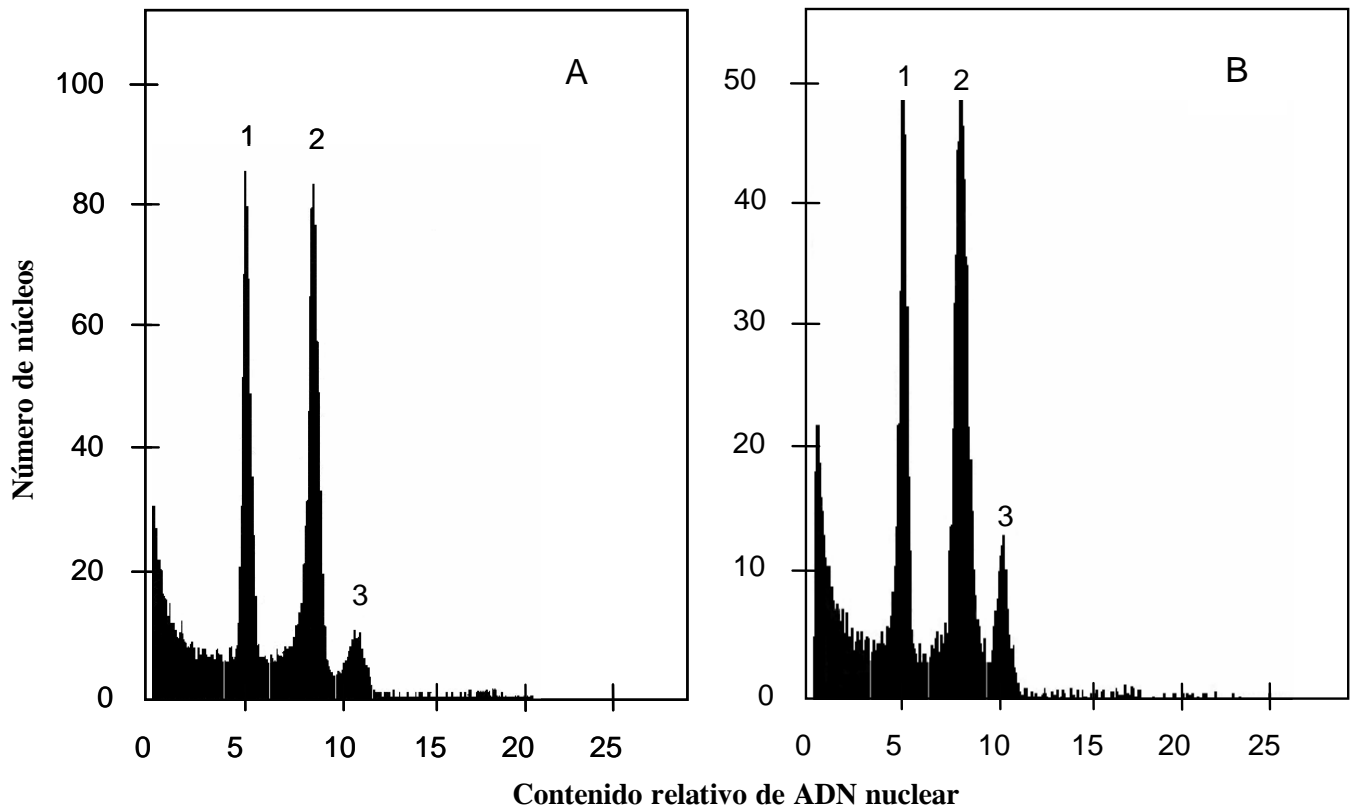


Figura 1. Estimación del contenido de ADN nuclear en picogramos por citometría de flujo. (A) Los histogramas 1 y 3 representan los núcleos en G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> de Zea mays (planta de referencia) y el histograma 2, los núcleos en G<sub>1</sub> de A. angustifolia diploide (2n=2x=60) de la población de El Bajío. (B) Los histogramas 1 y 3 representan los núcleos en G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> de Zea mays y el histograma 2 los núcleos en G<sub>1</sub> de A. rhodacantha (2n = 2x = 60) de la población de El Bajío. Número de núcleos por individuo X = 30 000.

Cuadro 1. Contenido de ADN nuclear y tamaño del genoma en Agave angustifolia y Agave rhodacantha.

Especie	Localidad	Nivel de ploidía	Contenido de 2C ADN ± EE (pg*)	Tamaño del genoma 1Cx (Mpb**)
<i>A. angustifolia</i>	El Bajío	2x = 60	8.514 ± 0.032 a	4172 a
<i>A. angustifolia</i>	Los Mochomos	2x = 60	8.479 ± 0.030 a	4155 a
<i>A. angustifolia</i>	El Chorro	2x = 60	8.505 ± 0.028 a	4167 a
<b>Promedio</b>			<b>8.499 ± 0.030</b>	<b>4165</b>
<i>A. rhodacantha</i>	El Bajío	2x = 60	8.504 ± 0.093 a	4167 a
<i>A. rhodacantha</i>	Los Mochomos	2x = 60	8.326 ± 0.037 b	4080 b
<b>Promedio</b>			<b>8.415 ± 0.065</b>	<b>4124</b>

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05); EE = Error estándar.

\* = Picogramos; \*\* = Millones de pares de bases.

(Palomino *et al.*, 2005). Sin embargo, son superiores a los promedios observados para esta especie (2C-ADN = 7.0) por Finch y Osborne (1990) y Cavallini *et al.* (1996) para *A. angustifolia* var. *marginata* (2C-ADN = 8.0 pg). Estas diferencias probablemente sean debidas a que en estos últimos se utilizaron otras plantas de referencia. El contenido total de ADN en los diploides de Oaxaca (8.477 pg) fue significativamente menor que el de los triploides (12.420 pg). El valor 1Cx de diploides: 4139 Mpb (8.477 pg / 2 x 980 Mpb = 4139 Mpb) aumentó significativamente en comparación con los triploides: 4057 Mpb (12.420 pg / 3 x 980 Mpb = 4057 Mpb). Los valores de ambas variables para la población diploide, resultaron ligeramente inferiores a las tres poblaciones de *A. angustifolia* aquí estudiadas.

Palomino *et al.* (2003) analizaron el tamaño de genoma de ocho variedades de *Agave tequilana* mediante CF, y encontraron seis diploides (2n = 2x = 60, 2C-ADN = 8.304-8.517 pg), una triploide (2n = 3x = 90, 2C-ADN = 12.513 pg) y otra con plantas tetraploides (2n = 4x = 120, 2C-ADN = 16.01 pg) y pentaploides (2n = 2x = 150, 2C-ADN = 20.11 pg). Los valores de 2C-ADN revelaron una relación entre el nivel de ploidía y el contenido de ADN. Los valores 2C-ADN y 1Cx obtenidos en el presente trabajo para *A. angustifolia* y *A. rhodacantha* procedente de El Bajío, resultaron similares a la variedad diploide 'Pata de mula' de *A. tequilana*, pero superiores a los determinados para las variedades diploides de esta misma especie: 'Lineño', 'Azul Listado', 'Azul', 'Moraleño' y 'Xingüín', cuyos valores resultaron más cercanos al de *A. rhodacantha* procedente de Los Mochomos.

Todas estas investigaciones establecen que los valores 2C-ADN y 1Cx son de utilidad para diferenciar especies de un mismo género y los niveles de ploidía (citotipos numéricos) de una misma especie. Aún más, como en el caso de *A. tequilana*, pueden utilizarse para distinguir entre variedades de una especie con el mismo número de cromosomas, resultado similar a lo aquí observado para las poblaciones de *A. rhodacantha* (2n = 60) de El Bajío y Los

Mochomos. Sin embargo, esto no ocurrió entre las poblaciones de *A. angustifolia* (Cuadro 1).

### Análisis cariotípico

Todas las plantas de *A. angustifolia* y *A. rhodacantha* estudiadas fueron diploides 2n = 2x = 60. Los cariotipos mostraron 5 pares de cromosomas largos y 25 pares de cromosomas pequeños (Cuadro 3; Figuras 2, 3 y 4), que corresponden a cariotipos bimodales, característicos del género *Agave*, independientemente del nivel de ploidía (Pinkava y Baker, 1985; Banerjee y Sharma, 1988, 1989; Castorena-Sánchez *et al.*, 1991; Palomino *et al.*, 2005). Estos autores también observaron que en *Agave* existen diferencias grandes en la estructura de los cromosomas a nivel inter o intraespecífico.

En este trabajo se determinaron dos citotipos estructurales para *A. angustifolia*. Las plantas de Los Mochomos y El Chorro presentaron un citotipo similar que correspondió a 48m + 2sm + 6st + 4t, diferente del encontrado en las plantas colectadas en El Bajío que mostraron otro citotipo formado por 42m + 4sm + 10st + 4t. Ambos citotipos variaron en la proporción de cromosomas pequeños meta-céntricos, submetacéntricos y subtelocéntricos, pero fueron similares en la morfología de sus cromosomas largos (Cuadros 2 y 3). Esto resulta congruente al considerar que las poblaciones estudiadas en Los Mochomos y El Chorro se encuentran a 2.02 km de distancia entre ellas y presentan el mismo citotipo, mientras que la población de El Bajío que presenta el otro citotipo, se localiza a 8.27 km de Los Mochomos y a 9.66 km de El Chorro. La distancia entre las poblaciones más las barreras físicas como cerros y vegetación, son factores que impiden el flujo génico entre ellas y causan el aislamiento biogeográfico o reproductivo, y facilitan la diferenciación de las poblaciones debido a la deriva genética.

Cuadro 2. Análisis cariotípico de las poblaciones de *Agave angustifolia* y *Agave rhodacantha* (2n = 2x = 60).

Especie	Localidad	Fórmula cariotípica	Intervalo de longitud de los cromosomas ( $\mu\text{m}$ )	Constricción secundaria	Longitud total del genoma ( $\mu\text{m}$ ) $\bar{X} \pm \text{EE}$	Índice de asimetría (TF %) $\bar{X} \pm \text{EE}$
<i>A. angustifolia</i>	El Bajío	42m+4sm+10st+4t	1.11-6.30	2t	137.4 $\pm$ 0.6 c	32.6 $\pm$ 0.3 c
<i>A. angustifolia</i>	Los Mochomos	48m+2sm+6st+4t	1.11-4.81	2t	113.7 $\pm$ 0.6 a	35.5 $\pm$ 0.3 d
<i>A. angustifolia</i>	El Chorro	48m+2sm+6st+4t	1.11-5.93	2t	129.6 $\pm$ 0.5 b	33.5 $\pm$ 0.3 c
<i>A. rhodacantha</i>	El Bajío	40m+6sm+4st+10t	0.92-5.56	2st	140.3 $\pm$ 0.6 d	29.6 $\pm$ 0.3 b
<i>A. rhodacantha</i>	Los Mochomos	40m+6sm+4st+10t	0.93-5.93	2st	142.7 $\pm$ 0.6 d	27.9 $\pm$ 0.3 a

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.01); EE = Error estándar.

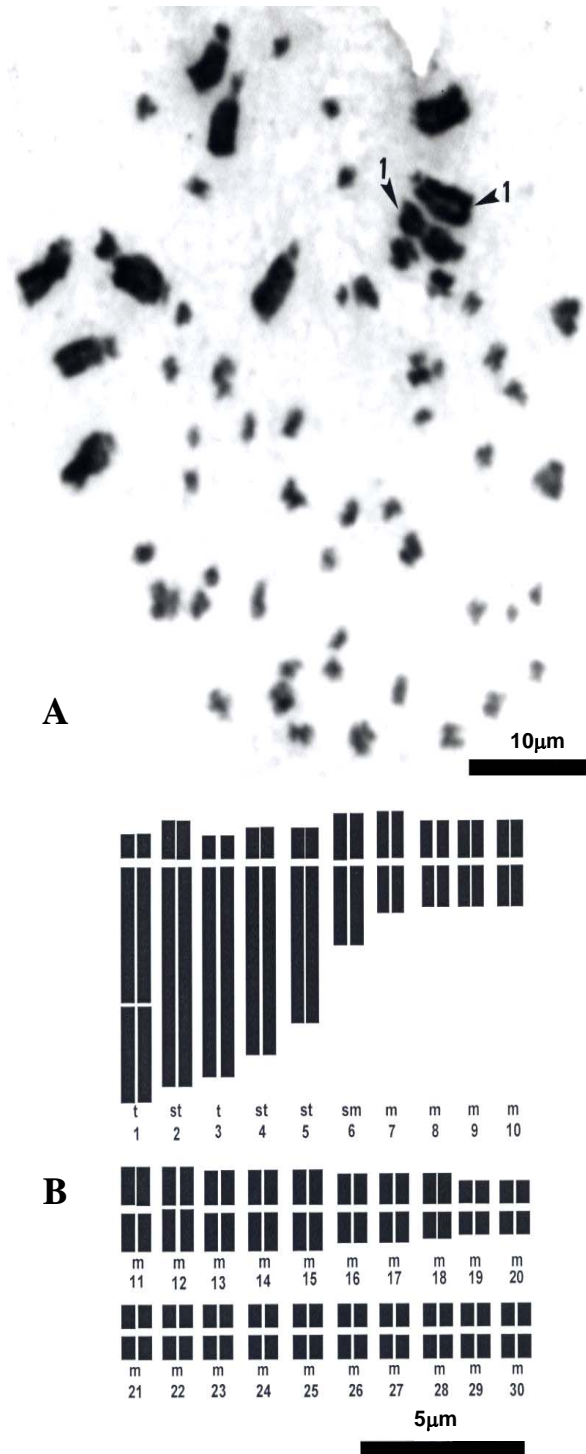


Figura 2. Citotipo de *Agave angustifolia* ( $2n = 2x = 60$ ). (A) Célula con cromosomas metafásicos. (B) Idiograma con una fórmula cariotípica de  $48m + 2sm + 6st + 4t$  de la población de El Chorro. Las flechas y números indican el par de cromosomas homólogos con constricciones secundarias en los brazos largos.

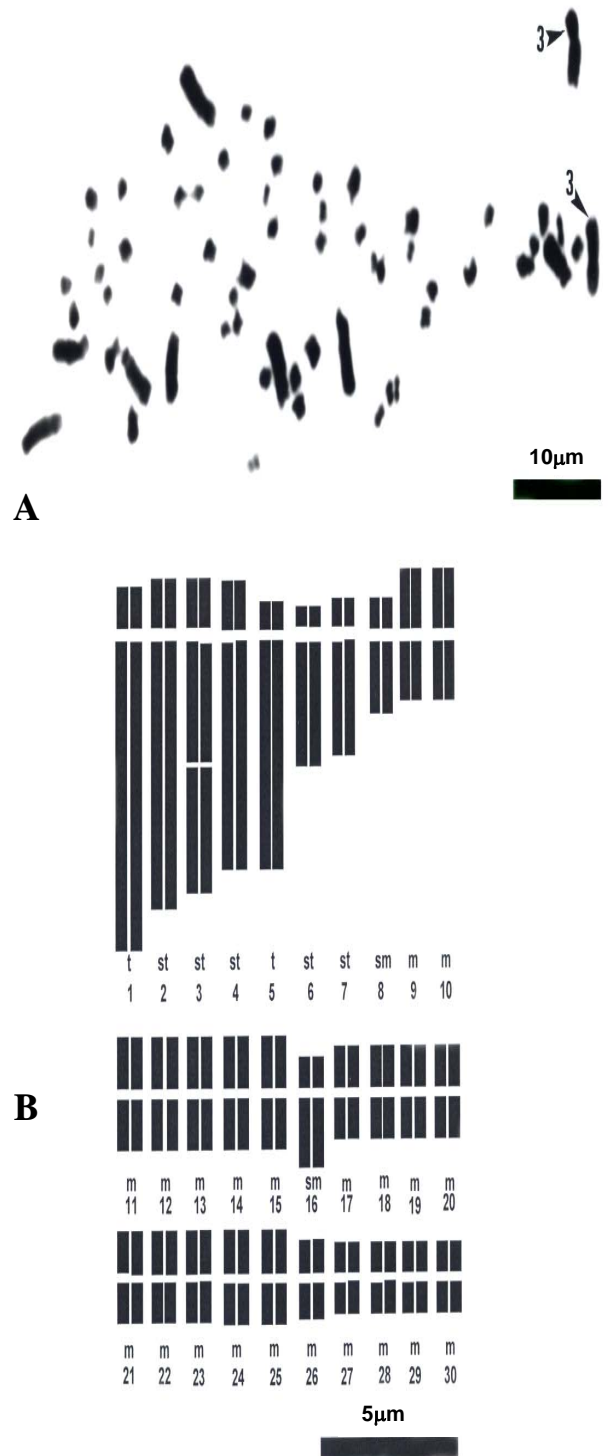


Figura 3. Citotipo de *Agave angustifolia* ( $2n = 2x = 60$ ). (A) Célula con cromosomas metafásicos. (B) Idiograma con una fórmula cariotípica de  $42m + 4sm + 10st + 4t$  de la población de El Bajío. Las flechas y números indican el par de cromosomas homólogos con constricciones secundarias en los brazos largos.

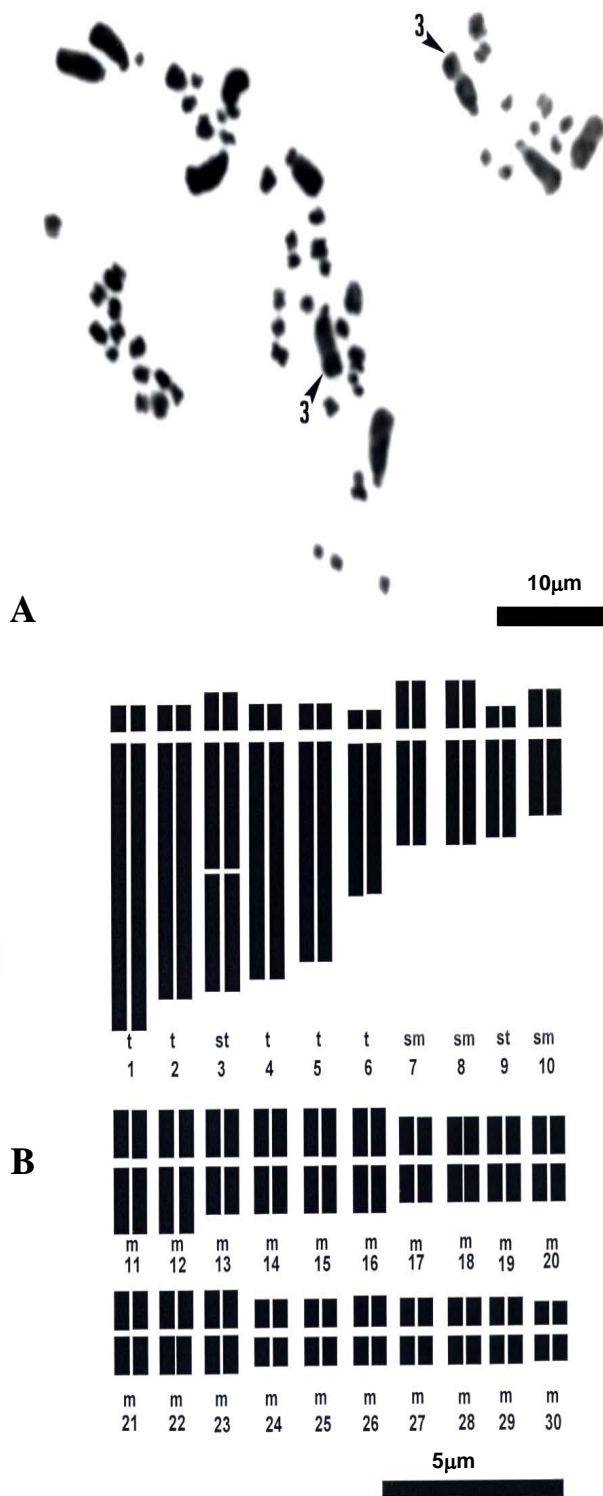


Figura 4. Cariotipo de *Agave rhodacantha* ( $2n = 2x = 60$ ). (A) Célula con cromosomas metafásicos. (B) Idiograma con una fórmula cariotípica de  $40m + 6sm + 4st + 10t$  de la población de El Bajío. Las flechas y números indican el par de cromosomas homólogos con constricciones secundarias en los brazos largos.

Castorena-Sánchez *et al.* (1991) determinaron el número de cromosomas y la variación cariotípica en cuatro taxones de la Sección Rigidiae: *Agave fourcroydes* ( $5x = 150$ ), *A. angustifolia* ( $6x = 180$ ), *A. angustifolia* var. *marginata* ( $2x = 60$ ) y *A. tequilana* ( $2x = 60$ ), además de dos taxones de la Sección Sisalanae: *A. sisalana* ( $2x = 60$ ) y el híbrido 11648 por retrocruza entre *A. amaniensis* X *A. angustifolia* (X *A. amaniensis*) ( $2x = 60$ ). El análisis de las fórmulas cariotípicas les permitió establecer que, aun cuando se mantiene la proporción de 5 cromosomas largos (todos acrocéntricos, uno de ellos con una constricción secundaria) y 25 cortos, existen diferencias entre especies, sobre todo en la proporción de subtelo-céntricos, metacéntricos y submetacéntricos en los cromosomas cortos. Estos autores analizaron cinco individuos por población y varias células por espécimen (número no especificado), sin observar variaciones en un mismo organismo ni entre ejemplares de la misma población. Esta consistencia en los cariotipos también se encontró en una investigación que desarrollaron algunos autores del presente trabajo (GP y JM, datos no publicados), con ocho variedades de *A. tequilana*, y utilizando de tres a cinco plantas por población y tres a nueve células por individuo. Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se considera que el número de individuos evaluados indica el cariotipo de las poblaciones de *A. angustifolia* y *A. rhodacantha* en los sitios de El Bajío, Los Mochomos y El Chorro, con excepción de la primera especie en Los Mochomos, ya que sólo se estudiaron dos individuos. Así mismo, el índice de similitud obtenido en la sierra alta de Sonora para *A. angustifolia*, mediante marcadores moleculares AFLPs (Barraza-Morales *et al.*, 2006), señalan una prevalencia de mecanismos de propagación asexual que favorece una menor variación en los cariotipos.

Las dos poblaciones de *A. rhodacantha* evaluadas presentaron el mismo cariotipo con  $40m + 6sm + 4st + 10t$ , diferente al de los dos citotipos encontrados en las tres poblaciones de *A. angustifolia*. Las diferencias son evidentes debido a que los citotipos de *A. angustifolia* presentan dos cromosomas largos telocéntricos con constricciones secundarias, dos cromosomas largos telocéntricos sin constricciones secundarias y seis cromosomas largos subtelo-céntricos y no presentan cromosomas cortos telocéntricos, mientras que el genoma de *A. rhodacantha* presenta dos cromosomas largos subtelo-céntricos con constricciones secundarias (Crom. 3), ocho cromosomas largos telocéntricos y dos cromosomas cortos telocéntricos (Crom. 6 y 9). Además, muestran diferencias en las proporciones de cromosomas cortos submetacéntricos y metacéntricos (Cuadros 2 y 3; Figura 2).

Se encontraron diferencias significativas en los valores de LTG y TF % del complemento cromosómico entre



Cuadro 3. Longitudes promedio ( $\mu\text{m}$ ) totales y de los brazos largos de cromosomas en metafase mitótica de poblaciones de *A. angustifolia* y *A. rhodacantha* de Sonora, México.

Cromosoma	Especie									
	<i>A. angustifolia</i>						<i>A. rhodacantha</i>			
	El Bajío		Mochomos		El Chorro		El Bajío		Mochomos	
	LT	LBL	LT	LBL	LT	LBL	LT	LBL	LT	LBL
1	6.30	5.56	4.81	4.44	5.93	5.37	5.56	5.00	5.93	5.37
2	5.56	4.63	4.63	3.70	5.93	5.00	5.56	5.00	5.93	5.26
3	5.19	4.26	4.37	4.00	5.56	5.00	5.56	4.82	5.93	5.12
4	5.19	4.26	4.07	3.33	5.19	4.45	5.19	4.63	5.56	5.19
5	4.81	4.26	4.07	3.33	4.44	3.70	4.81	4.25	5.19	4.82
6	2.59	2.22	2.22	1.48	2.96	1.85	3.33	2.96	3.33	2.96
7	2.59	2.03	1.86	0.93	2.22	1.11	2.96	2.03	2.59	1.85
8	1.85	1.30	1.86	0.93	2.04	1.04	2.96	2.03	2.59	1.85
9	2.22	1.11	2.22	1.11	2.04	1.04	2.22	1.85	2.22	1.85
10	2.22	1.11	1.48	0.74	2.04	1.04	2.22	1.48	2.22	1.48
11	1.85	0.93	1.48	0.74	1.85	0.93	2.22	1.29	2.22	1.29
12	1.85	0.93	1.48	0.74	1.85	0.93	2.22	1.29	2.22	1.29
13	1.85	0.93	1.48	0.74	1.66	0.85	1.85	0.93	1.85	0.93
14	1.85	0.93	1.48	0.74	1.66	0.85	1.85	0.93	1.67	0.86
15	1.85	0.93	1.48	0.74	1.66	0.85	1.85	0.93	1.67	0.86
16	1.85	1.30	1.48	0.74	1.48	0.74	1.85	0.93	1.67	0.86
17	1.48	0.74	1.48	0.74	1.48	0.74	1.48	0.74	1.67	0.86
18	1.48	0.74	1.40	0.70	1.48	0.74	1.48	0.74	1.67	0.86
19	1.48	0.74	1.30	0.67	1.11	0.56	1.48	0.74	1.30	0.67
20	1.48	0.74	1.11	0.56	1.11	0.56	1.48	0.74	1.30	0.67
21	1.48	0.74	1.11	0.56	1.11	0.56	1.48	0.74	1.30	0.67
22	1.48	0.74	1.11	0.56	1.11	0.56	1.48	0.74	1.30	0.67
23	1.48	0.74	1.11	0.56	1.11	0.56	1.48	0.74	1.30	0.67
24	1.48	0.74	1.11	0.56	1.11	0.56	1.11	0.56	1.30	0.67
25	1.48	0.74	1.11	0.56	1.11	0.56	1.11	0.56	1.30	0.67
26	1.30	0.76	1.11	0.56	1.11	0.56	1.11	0.56	1.30	0.67
27	1.11	0.56	1.11	0.56	1.11	0.56	1.11	0.56	1.30	0.67
28	1.11	0.56	1.11	0.56	1.11	0.56	1.11	0.56	1.30	0.67
29	1.11	0.56	1.11	0.56	1.11	0.56	1.11	0.56	1.30	0.67
30	1.11	0.56	1.11	0.56	1.11	0.56	1.92	0.48	0.93	0.49

LT= Longitud total; LBL= Longitud de brazo largo.

las poblaciones estudiadas de ambas especies, con excepción de LTG entre las poblaciones de *A. rhodacantha*. LTG fue mayor en *A. rhodacantha* que en *A. angustifolia*

(Cuadro 2) mientras que en el TF % ocurrió lo contrario. También se observaron diferencias en el intervalo en la longitud de los cromosomas. Estos resultados indican que

el arreglo lineal de los genes en los cromosomas es diferente en las dos especies y más parecidos entre los dos citotipos de *A. angustifolia*. Las poblaciones de *A. angustifolia* de Oaxaca analizadas por Palomino *et al.* (2005) presentaron dos citotipos diferentes; uno diploide ( $2n=2x=60$ ) y otro triploide ( $2n=3x=90$ ), con valores superiores en LTG y TF % al compararlos con las dos especies de *Agave* de Sonora aquí estudiadas. Palomino *et al.* (2005) observaron diferencias significativas en la LTG, LTG-1Cx (longitud total del genoma de grupo de cromosomas monoploide) y TF % entre los dos citotipos de *A. angustifolia* provenientes de Oaxaca, con notables diferencias en sus respectivas fórmulas cariotípicas.

Los resultados aquí descritos apoyan lo establecido en investigaciones anteriores (Castorena-Sánchez *et al.*, 1991; Palomino *et al.*, 2005) sobre la existencia de un proceso de especiación en los agaves debido a rearrreglos cromosómicos que corresponden a mutaciones heterocigóticas espontáneas, como deficiencias, translocaciones, fusiones y fisiones robertsonianas y a mutaciones puntuales en los cromosomas de sus genomas, que han sido la causa de la variación de citotipos numéricos y estructurales, que son la principal forma de evolución en las especies de *Agave*, aunque conservan sus cariotipos bimodales. La caracterización del genoma (tamaño, composición, nivel de ploidía y cariotipo) en *Agave*, coadyuva en estudios sobre mejoramiento genético (planeación de cruces), biotecnología (micropropagación de plantas elite) y selección de plantas con características agronómicas sobresalientes (tallos de peso elevado, tolerancia al estrés hídrico, alto contenido de azúcares).

### CONCLUSIONES

Las diferencias observadas en el tamaño del genoma y en los cariotipos dentro y entre las especies de *Agave angustifolia* y *A. rhodacantha*, evidencian un proceso de especiación debido a rearrreglos estructurales en el grupo de cromosomas grandes y pequeños. Estos análisis permitieron corroborar la presencia de citotipos estructurales en *A. angustifolia*, aunque en *A. rhodacantha* se observó el mismo citotipo. Estas investigaciones son básicas para coadyuvar a esclarecer la taxonomía de *Agave* y a seleccionar biotipos con características productivas deseables para utilizarlos en programas de conservación y mejoramiento genético de la materia prima empleada en la producción de bacanora.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la M. en C. Miriam Laad Otero del Instituto de Biología, UNAM, por su participación en los análisis de citometría de flujo. De igual manera a

los M. en C. Alfonso Sánchez, Andrés Ochoa y Aldo Gutiérrez del CIAD, A. C. y a las Ecól. Martha Coronado Andrade e Isabel Encinas Romero del CESUES, por su colaboración en el trabajo de campo y análisis de datos. Así mismo al Dr. Abisaí García-Mendoza del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM, por la identificación de las especies de agave.

### BIBLIOGRAFÍA

- Arumuganathan K, S P Tallury, M L Fraser, A H Bruneau, R Qu (1999) Nuclear DNA content of thirteen turfgrass species by flow cytometry. *Crop Sci.* 39:1518-1521.
- Banerjee S, A K Sharma (1987) Cytophotometric estimation of nuclear DNA in different species and varieties of *Agave*. *Cytologia* 52:85-90.
- Banerjee S, A K Sharma (1988) Structural differences of chromosomes in diploid *Agave*. *Cytologia* 53:415-420.
- Banerjee S, A K Sharma (1989) Structure and behaviour of chromosomes in four different species of *Agave*. *Cytologia* 54:667-672.
- Barraza-Morales A, F L Sánchez, M Robert, M Esqueda, A Gardea (2006) Variabilidad genética en *Agave angustifolia* Haw. de la sierra sonorense determinada con marcadores AFLP. *Rev. Fitotec. Mex.* 29:1-8.
- Bennett M D, I J Leitch (1995) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Ann. Bot.* 76:113-176.
- Bennett M D, P Bandol, I J Leitch (2000) Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses-807 new estimates. *Ann. Bot.* 86:859-909.
- Bonos S A, K A Plumely, W A Meyer (2002) Ploidy determination in *Agrostis* using flow cytometry and morphological traits. *Crop Sci.* 42:192-196.
- Brandham P E (1969) Inversion heterozygosity and sub-chromatid exchange in *Agave stricta*. *Chromosoma (Berlin)* 26:270-286.
- Brandham P E, M J Doherty (1998) Genome size variation in the Aloaceae, an angiosperm family displaying karyotypic orthoselection. *Ann. Bot.* 82 (Suppl. A):67-73.
- Castorena-Sánchez I, R M Escobedo, A Quiroz (1991) New cytogenetical determinants recognized in six taxa of *Agave* in the sections Rigidae and Sisalanae. *Can. J. Bot.* 69:1257-1264.
- Cavallini A, L Natalli, G Ciononi, I Castorena-Sánchez (1996) Cytophotometric and biochemical analyses of DNA in pentaploid and diploid *Agave* species. *Genome* 39:266-271.
- Dolezel J (1997) Applications of flow cytometry for study of plant genomes. *J. Appl. Gen.* 38:285-302.
- Dolezel J, W Göhde (1995) Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry* 19:103-106.
- Dolezel J, J Greilhuber, S Lucretti, A Meister, M A Lysák, L Nardi, R Obermayer (1998) Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Ann. Bot.* 82 (Suppl. A):17-26.
- Finch R A, J F Osborne (1990) Chromosome numbers and DNA amounts in *Agave* variants. *East African Agric. For. J.* 55:213-218.
- García-Mendoza A (2002) Distribution of *Agave* (Agavaceae) in México. *Cactus and Succulent J.* 74:177-188.
- Gentry H S (1982) *Agaves of Continental North America*. University of Arizona Press. Tucson, USA. 670 p.
- Greilhuber J, J Dolezel, M A Lysák, M D Bennett (2005) The origin, evolution and proposed stabilization of the terms "genome size" and "C-value" to describe nuclear DNA contents. *Ann. Bot.* 95:255-260.
- Gupta R, P K Gupta (1978) Karyotypic studies in the genus *Crotalaria* Linn. *Cytologia* 43:357-369.

- Hintze J (2001)** NCSS and PASS. Number cruncher statistical system. Version 2001. Kaysville, USA.
- Levan A, K Fredga, A A Sandberg (1964)** Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.
- Otto F (1990)** DAPI staining of fixed cells for high resolution flow cytometry of nuclear DNA. *In: Methods in Cell Biology*. H A Crissman, Z Darzynkiewics (eds). Academic Press. New York, USA. pp:105-110.
- Palomino G, J Dolezel, I Méndez, A Rubluo (2003)** Nuclear genome size analysis of *Agave tequilana* Weber. *Caryologia* 56:37-46.
- Palomino G, J Martínez, I Méndez (2005)** Citotipos en *Agave angustifolia* Haw. determinados por citometría de flujo y análisis de sus cariotipos. *Rev. Internal. Contam. Amb.* 21 (Supl. 1):49-54.
- Pinkava D J, M A Baker (1985)** Chromosome and hybridization studies of Agaves. *Des. Plant* 7:93-100.
- Ruvalcaba-Ruiz D, B Rodríguez-Garay (2002)** Aberrant meiotic behavior in *Agave tequilana* Weber var. *azul*. *BioMed Central Plant Biol.* 2:1-4.
- Zonneveld B J M (2003)** The systematic value of nuclear DNA content in *Agave* L. and some related genera of the Agavaceae. *Bradleya* 21:121-125.