

**DETERMINACIÓN DE MECANISMOS DE
RESTITUCIÓN MEIÓTICA EN DISTINTAS
ESPECIES DEL GÉNERO AGAVE**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO

ACADÉMICO DE

**DOCTOR EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA EN LA
ESPECIALIDAD DE
BIOTECNOLOGÍA PRODUCTIVA**

PRESENTA

M. en C. VÍCTOR MANUEL

GÓMEZ RODRÍGUEZ

GUADALAJARA, JAL. 02 DE DICIEMBRE DE 2013.

RESUMEN

El género *Agave* es endémico de América y se considera uno de los cultivos más representativos de México debido a su importancia en la economía del país. Se realizó el análisis citológico de la microsporogénesis en *Agave tequilana* var. 'Azul' y *A. angustifolia* var. 'Lineño' y 'Cimarrón'. Se encontraron diversas anormalidades como: puentes cromosómicos, cromosomas retrasados, micronúcleos, mónadas, diadas y triadas. El análisis morfológico del polen, junto con las microsporas $2n$ antes mencionadas, confirmó la presencia de polen $2n$ así como sus frecuencias. Se identificaron dos diferentes mecanismos de restitución en *A. tequilana* var. 'Azul' y *A. angustifolia* var. 'Lineño': el primer mecanismo es una falla en la citocinesis II, la cual dio lugar a la formación de diadas con dos células $2n$ y triadas con dos células n y una célula $2n$; el segundo mecanismo involucra un huso mitótico anormal, el cual dio lugar a la formación de triadas con dos células n y una célula $2n$. Así mismo, se observó la presencia de mónadas en ambas especies, lo cual pudo ser provocado por una falla en la citocinesis en ambas divisiones meióticas. Las diadas, triadas y polen gigante encontrados en las especies de *Agave*, indican la presencia de un mecanismo de restitución involucrado en la formación de gametos $2n$ en *A. tequilana* var. 'Azul' y *A. angustifolia* var. 'Lineño', el cual es equivalente a la Restitución de la Segunda División Meiótica.

Además de esto, se realizó un análisis citogénético en *A. tequilana* var. 'Azul', *A. cupreata* y *A. angustifolia* var. 'Lineño' y 'Cimarrón', el cual mostró que todas las especies poseían un número cromosómico diploide $2n = 60$, con un cariotipo bimodal compuesto de cinco pares de cromosomas grandes y 25 pares de cromosomas pequeños. Así mismo, se observaron diferentes fórmulas cariotípicas con una constricción secundaria en un par de cromosomas grandes en todas las especies. Se utilizó la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para el mapeo físico del 5S y 45S de ADN ribosomal (ADNr). Todas las especies analizadas mostraron que el 5S de ADNr se localizó en ambos brazos de un par de cromosomas pequeños, mientras que el 45S de ADNr estaba asociado a la constricción secundaria de un par de cromosomas grandes. Los datos del análisis de la FISH aportan nueva información acerca de la posición y número de los *loci* de ADNr y ayudan en la detección de híbridos en programas de mejoramiento así como en estudios evolutivos en el género.

ABSTRACT

Agave is endemic of America and is one of the most important crop in Mexico due to its key role in the country's economy. A cytological analysis of the microsporogenesis was carried out in *Agave tequilana* var. 'Azul' and *A. angustifolia* var. 'Lineño' and 'Cimarron'. Several abnormalities such as chromosomal bridges, lagging chromosomes, micronuclei, monads, dyads and triads were found. The morphological analysis of the pollen, together with the above-mentioned $2n$ microspores, confirmed the presence of $2n$ pollen as well as its frequency. In both *A. tequilana* var. 'Azul' and *A. angustifolia* var. 'Lineño' two different mechanisms were observed: the first mechanism is a failure in the cytokinesis in meiosis II which caused the formation of dyads with two $2n$ cells and triads containing two n cells and one $2n$ cell; the second mechanism involves an abnormal spindle, which caused the formation of triads with two n cells and one $2n$ cell. Likewise, the presence of monads was detected in both species, these, might be caused by a failure of the cytokinesis in both meiotic divisions. Diads, triads and giant pollen found in *Agave* species indicate the presence of a restitution mechanism involved in $2n$ gamete formation in *A. tequilana* var. 'Azul' and *A. angustifolia* var. 'Lineño', which is equivalent to a Second Division Restitution mechanism.

Besides this, cytogenetic analysis was carried out in *A. tequilana* var. 'Azul', *A. cupreata* and *A. angustifolia* var. 'Lineño' and 'Cimarron' showed that in all species the diploid chromosome number was $2n = 60$, with bimodal karyotypes composed of five pairs of large chromosomes and 25 pairs of small chromosomes. Furthermore, different karyotypical formulae as well as a secondary constriction in a large chromosome pair were found in all species. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) was used for physical mapping of 5S and 45S ribosomal DNA (rDNA). All species analyzed showed that 5S rDNA was located in both arms of a small chromosome pair, while 45S rDNA was associated with the secondary constriction of a large chromosome pair. Data of FISH analysis provides new information about the position and number of rDNA *loci* and helps for detection of hybrids in breeding programs as well as evolutionary studies.

AGRADECIMIENTOS

Al escribir esta última parte de la tesis y en la soledad de mi escritorio, he pensado en todo lo que ha tenido que suceder para que en este preciso momento me encuentre escribiendo los “Agradecimientos”; todas las situaciones que viví y las que ¡¡faltan¡¡. En este momento, es preciso mencionar que todo esto no lo hubiera logrado de no ser por la comprensión y el apoyo incondicional de Yadhira (¡¡quiero mi chole¡¡), el gran amor de mi vida y madre de mis queridas hijas, Alejandra e Itzia, quienes también sin saberlo han sacrificado su tiempo que debí compartir con ellas, en aras del término de este trabajo. A mis padres (y héroes) Manuel y Elva, que les debo lo que soy, quienes a través de su apoyo y motivación me enseñaron que a través del trabajo y dedicación se pueden lograr muchas cosas, sin importar las dificultades que se presenten. A mis hermanas Rocío y Claudia, que aunque el destino nos ha separado, siempre se han interesado en mi trabajo y son para mí un modelo a seguir.

También quiero agradecer a mi Director, gracias Rodrigo por compartir tus conocimientos; al Dr. Benjamín, por sus comentarios y cuestionamientos a mi trabajo durante todo este tiempo, así como los momentos de relax en las colectas; a Paty Dupré, cuyas pláticas en el lab así como su apoyo, consejos y discusiones de mi trabajo hubieran sido más difíciles de sobrellevar de no haber sido por su ayuda; a Manuel Rodríguez, quién siempre me ayudó y compartimos momentos muy amenos con muchos de sus chistes (aunque algunos fueron muy malos); quiero agradecer también a los Drs. Ernesto, Joaquín, Gabriel, Evangelina, Nutan y todos aquéllos que omití, perdón, por formar parte de mis enseñanzas y por ser una guía en esta parte de mi vida. A la Dra. Guadalupe Palomino y al MC Javier Martínez, por su ayuda en la elaboración de los cariotipos de las especies de *Agave* y a los miembros de mi comité tutorial.

No puedo dejar pasar la oportunidad para agradecer a todos los miembros del Laboratorio de Biotecnología Vegetal con los que compartí momentos muy agradables, como olvidar aquéllos ratos de relax, los paseos en el laboratorio, las fotografías, las comidas (jajaja), los desempances, etc; Cristobal, Diego, Chivis, Pablo, Alma, Gislem, Chuy, Laura, Gabriel y a todos aquéllos que les tocó estar en el lab durante mi estancia; a la Mansión, cuyos habitantes:

Li, Héctor, Marcela, Anita, Vivi, Laura, Rodrigo, Sergio (que todos creían que vivía ahí) pasamos tardes y noches de desvelo, que si al inicio eran por tareas;;; poco a poco se llegaron a convertir en reuniones de discusión muy amenas, y en donde al final, siempre había una sonrisa para compartir y apoyarnos mutuamente.

También quiero agradecer el apoyo y amistad de mis compañeros de generación Chuck, José Luis, Omar y en general a todos que en algún momento se detuvieron y compartieron algo conmigo.

Gracias....

Finalmente, quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (No. de registro 45382), sin la cual no hubiera sido posible nada de esto así como el financiamiento del proyecto de Ciencia Básica (24554).

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
I. ANTECEDENTES	1
II. DEFINICIÓN DEL TEMA	3
III. JUSTIFICACIÓN	4
IV. OBJETIVOS	5
IV.1 Objetivo general	5
IV.2 Objetivos específicos	5
V. FUNDAMENTACIÓN	6
V.1 Familia Agavaceae	6
V.2 Género <i>Agave</i>	7
V.2.1 Taxonomía del género	7
V.2.2 Cariotipos del género	9
V.2.3 Morfología del género	10
V.2.4 Características reproductivas en el género	12
V.2.5 Distribución y endemismo del género	12
V.2.6 Características de las especies de <i>Agave</i> en estudio	13
V.3 Poliploidía en plantas	14
V.3.1 Efectos genéticos de la poliploidía	15
V.3.2 Orígen de la poliploidía	16
V.3.2.1 Meiosis	17
V.3.2.2 Orígen de los gametos $2n$ y sus consecuencias genéticas	18
V.3.2.3 Detección de los gametos $2n$	22
V.3.2.4 Importancia de los gametos $2n$ en el mejoramiento genético	23

V.4 Secuencias repetitivas	25
V.4.1 ADN ribosomales 5S y 45S	26
V.5 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	27
VI. METODOLOGÍA	29
VI.1 Materiales.....	29
VI.1.1 Microorganismos	29
VI.1.2 Plásmido/Vector.....	29
VI.1.3 Material vegetal	30
VI.1.4 Reactivos y soluciones químicas	31
VI.2 Métodos	31
VI.2.1 Determinación de mecanismos de restitución.....	31
VI.2.1.1 Análisis de la microsporogénesis	31
VI.2.1.2 Ocurrencia y frecuencia de polen <i>2n</i>	31
VI.2.2 Mapeo físico del 5S y 45S de ADN ribosomal (ADNr) de trigo y <i>Agave</i>	32
VI.2.2.1 Clonación de las secuencias de ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’.....	32
VI.2.2.1.1 Extracción de ADN genómico de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’	32
VI.2.2.1.2 Amplificación de las secuencias de ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’	33
VI.2.2.1.3 Purificación de los fragmentos de ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’	34
VI.2.2.1.4 Ligación del inserto	35
VI.2.2.1.5 Células electrocompetentes <i>Escherichia coli</i> DH5 α	35
VI.2.2.1.6 Transformación.....	36
VI.2.2.1.7 Verificación de la presencia de las secuencias de ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’ y aislamiento de colonias transformadas.....	36
VI.2.2.1.8 Aislamiento de plásmidos.....	37
VI.2.2.1.9 Secuenciación y edición de los fragmentos de ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’	37
VI.2.2.2 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente con ADNr de trigo y <i>Agave</i>	37
VI.2.2.2.1 Preparaciones cromosómicas.....	37
VI.2.2.2.2 Sondas marcadas de ADNr.....	38
VI.2.2.2.3 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	39
VII. RESULTADOS.....	41

VII.1 Determinación del mecanismo de restitución involucrado en la formación de polen $2n$ en las especies de <i>Agave</i>	41
VII.1.1 Análisis de la microsporogénesis	41
VII.1.1.1 Microsporogénesis	41
VII.1.1.2 Asincronía de la microsporogénesis	43
VII.1.1.3 Anormalidades en la microsporogénesis.....	44
VII.1.1.4 Ausencia de la citocinesis en la meiosis II.....	46
VII.1.1.5 Falla en el huso mitótico	49
VII.1.2 Ocurrencia y frecuencia de polen $2n$	50
VII.2 Mapeo físico del 5S y 45S de ADNr de trigo y <i>Agave</i>	54
VII.2.1 Clonación de las secuencias de ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’	54
VII.2.1.1 Aislamiento del ADN genómico de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’	54
VII.2.1.2 Amplificación de la secuencia del 5S de ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’..	55
VII.2.1.3 Amplificación de la secuencia del 18S de ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’	55
VII.2.1.4 Amplificación de las secuencias del 5.8S y 26S de ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’	56
VII.2.1.5 Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α con ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’	57
VII.2.1.6 Obtención de las secuencias parciales de los ADNr por secuenciación.	59
VII.2.2 Análisis de las secuencias parciales de ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’	61
VII.2.3 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente con sondas de ADNr	62
VII.2.3.1 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente con sondas de ADNr de trigo	62
VII.2.3.2 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente con sondas de ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’	64
VII.2.3.3 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente con sondas de ADNr de trigo y <i>Agave</i>	65
VII.2.3.4 Cariotipos de las especies de <i>Agave</i>	67
VIII. CONCLUSIONES.....	72
IX. REFERENCIAS	75
X. ANEXO 1.....	98

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
Cuadro 1. Número total de especies de la familia Agavaceae en México.....	6
Cuadro 2. Iniciadores empleados en la amplificación de los ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’.....	33
Cuadro 3. Condiciones de reacción empleadas en la amplificación de los ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’.	34
Cuadro 4. Dilución de los anticuerpos para la detección por fluorescencia.	39
Cuadro 5. Frecuencias observadas de triadas, diadas, mónadas y polen $2n$ en dos especies de <i>Agave</i>	46
Cuadro 6. Codificación de las colonias de <i>E. coli</i> transformadas con los fragmentos de ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’ para su secuenciación.	59
Cuadro 7. Secuencias parciales del 5S de ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’.	59
Cuadro 8. Secuencia parcial del 18S de ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’.	60
Cuadro 9. Análisis cariotípico de las especies de <i>Agave</i> ($2n= 2x= 60$).	68

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Distribución del género <i>Agave</i>	8
Figura 2. Morfología general del género <i>Agave</i>	11
Figura 3. Representación de la meiosis.....	18
Figura 4. Descripción de los tres mecanismos de restitución nuclear en la microsporogénesis de especies monocotiledóneas con citocinesis sucesiva (Lilis).....	20
Figura 5. Representación de las unidades de repetición de los genes del 5S y 45S de ADNr.	27
Figura 6. Mapa del vector pGEM-T Easy.....	30
Figura 7. Microsporogénesis sucesiva en <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’ y <i>A. angustifolia</i> var. ‘Lineño’ y ‘Cimarrón’.....	42
Figura 8. Asincronía de la microsporogénesis en <i>A. angustifolia</i>	43
Figura 9. Anormalidades meióticas observadas en <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’ y <i>A. angustifolia</i> var. ‘Lineño’ y ‘Cimarrón’.....	45
Figura 10. Mecanismos de restitución meiótica en <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’ y <i>A. angustifolia</i> var. ‘Lineño y ‘Cimarrón’.....	47
Figura 11. Gel de calidad del ADN extraído de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’.....	54
Figura 12. Gel de agarosa al 1% del 5S de ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’.....	55
Figura 13. Gel de agarosa al 1% del 18S de ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’.....	56
Figura 14. Gel de agarosa al 1% del 5.8S de ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’.....	57
Figura 15. Análisis de las colonias de <i>E. coli</i> transformadas con la secuencia 5S de ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’.....	58
Figura 16. Análisis de las colonias de <i>E. coli</i> transformadas con la secuencia 18S de ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’.....	58
Figura 17. FISH del 5S y 45S de ADNr de trigo en las especies del género <i>Agave</i>	63
Figura 18. FISH del 5S y 18S de ADNr de <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’ en las especies del género <i>Agave</i>	64
Figura 19. FISH del 5S y 18S-45S de ADNr de trigo y <i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’ en las especies del género <i>Agave</i>	66

Figura 20. Idiogramas de los cariotipos de las especies de *Agave* indicando los sitios de hibridación del 5S y 18S de ADNr.....69

I. ANTECEDENTES

En la actualidad, el *Agave* es considerado un ícono de la identidad de México en todo el mundo, inclusive se ha considerado al Paisaje Agavero como Patrimonio Mundial declarado por la UNESCO, debido a la armonía entre la adaptación de la planta y el uso sustentable del suelo. Los agaves son plantas monocotiledóneas que se distribuyen desde el sur de Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela; en nuestro país se encuentran más del 75 % del total de las especies conocidas del género, por lo que se le considera el centro de origen, por su mayor riqueza y diversidad. En México, las especies de *Agave* han tenido y tienen una gran importancia desde tiempos prehispánicos, pues los diferentes grupos indígenas de nuestro país las utilizaban con un sinnúmero de usos; sin embargo, el desarrollo socioeconómico ha ido desplazando a estos últimos, por lo que en la actualidad la mayor importancia del género radica en la producción de tequila y más recientemente, la producción de mezcal.

En este trabajo se presentan dos vertientes de estudio de las especies del género *Agave*, por un lado, el análisis de la meiosis así como los mecanismos de restitución involucrados en la formación de gametos $2n$ y por otro, el mapeo físico de secuencias repetitivas de ADN ribosomal mediante la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y la obtención de los idiogramas correspondientes.

En el género se han reportado diferentes grados de ploidía, desde diploides hasta hexaploides; en la actualidad, se considera como uno de los posibles orígenes de las especies poliploides a los gametos $2n$ no reducidos, los cuales se producen en la mayoría de las angiospermas y poseen el doble del número cromosómico. Estos gametos se forman ya sea durante la micro- o megasporogénesis y se ha mencionado que su producción está controlada por genes que son influenciados por condiciones ambientales tales como la temperatura y el estrés hídrico y nutricional. Estudios citológicos han demostrado que existen varios mecanismos responsables de la formación de gametos $2n$, los cuales se conocen como mecanismos de restitución meiótica; dichos mecanismos se caracterizan por las diferentes consecuencias genéticas de cada uno de ellos. Recientemente, se ha comentado que algunas especies del género *Agave* producen polen $2n$, sin embargo, hasta la fecha no se han dilucidado los mecanismos que los

originan, pero se cree que son a través de estos gametos que se han generado los diferentes grados de ploidía existentes en el género.

El género *Agave* posee un número cromosómico básico $x = 30$ así como cariotipos bimodales que consisten en cinco cromosomas grandes y 25 cromosomas pequeños, característica que comparten todas las especies del género. Desde hace algunos años se ha reportado la presencia de citotipos estructurales y numéricos en diversas especies del género y no obstante de la importancia económica y social del género en el país, los trabajos acerca del mapeo físico de las especies del género es muy limitado, pues solamente unas cuantas especies han sido analizadas de las aproximadamente 166 que conforman el género. En la actualidad, el uso de la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en el mapeo físico de secuencias repetitivas en diferentes especies ha facilitado la identificación de cromosomas individuales, la organización de genomas, el análisis de híbridos en programas de mejoramiento y estudios evolutivos en plantas. Para esto, la FISH emplea sondas que son altamente repetitivas como son los ADN_r, que son secuencias altamente conservadas por lo que se emplean como marcadores moleculares, pues sus posiciones pueden llegar a ser específicas a un cromosoma y esto resulta útil en la elaboración de los cariotipos.

Debido a lo anterior, en este trabajo se realizó el análisis citológico de la meiosis en *Agave tequilana* y *A. angustifolia*, con el fin de identificar los mecanismos involucrados en la formación de gametos $2n$ en dichas especies, así como un análisis citogénético en *A. tequilana*, *A. cupreata* y *A. angustifolia*, en donde los ADN_r se utilizaron como sondas en la hibridación *in situ* fluorescente para identificar la posición y número de estos últimos y elaborar los idiogramas correspondientes. El conocimiento obtenido en este trabajo aporta las bases científicas para futuros programas de mejoramiento, identificación de especies en el género y estudios evolutivos en el mismo.

II. DEFINICIÓN DEL TEMA

Es posible dilucidar los mecanismos de restitución meiótica involucrados en la formación de gametos $2n$ en el género *Agave* y utilizar sondas de ADNr para el mapeo físico de las especies del género por hibridación *in situ* fluorescente.

III. JUSTIFICACIÓN

El mejoramiento genético de los cultivos se ha realizado desde hace miles de años a la par del desarrollo de la agricultura como tal. Este se realizó a través de la selección e hibridación de individuos con ciertas características deseadas para aumentar la productividad, la resistencia a enfermedades, tolerancia a sequías, frío, etc; sin embargo, en el caso del *Agave*, el mejoramiento genético se ha visto limitado por el tiempo de vida de la planta así como su uso comercial antes de la floración. En la actualidad, las investigaciones se han enfocado en determinar la variabilidad de acuerdo al mecanismo de propagación utilizado, por lo que otras alternativas a estos programas, son el uso de polen con el doble del número cromosómico, es decir, polen $2n$, así como la caracterización física de los cromosomas de las especies del género. Por un lado, al conocer los mecanismos de restitución involucrados en la formación de polen $2n$ en el género *Agave* se podrá utilizar este recurso, pues se conocerán las consecuencias genéticas del uso de dichos gametos y por otro, al identificar los sitios de hibridación de sondas repetitivas y su cariotipo correspondiente, se identificarán las características cromosómicas en las especies del mismo.

Estos conocimientos serán útiles en el desarrollo de programas de mejoramiento para la recuperación y conservación de los recursos genéticos del género, en la identificación de híbridos, estudios filogenéticos y/o evolutivos.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

Dilucidar los mecanismos de restitución meiótica en especies del género *Agave* y utilizar secuencias de ADNr para el mapeo físico de las especies del género.

IV.2 Objetivos específicos

1. Analizar la microspórogénesis en *Agave tequilana* var. 'Azul' y *A. angustifolia* var. 'Lineño' y 'Cimarrón'.
2. Determinar la presencia de polen gigante en *A. tequilana* y *A. angustifolia*.
3. Dilucidar los mecanismos de restitución responsables de la formación de polen $2n$ en *A. tequilana* y *A. angustifolia*.
4. Identificar el número y localización de los sitios de ADNr de trigo en *A. tequilana*, *A. cupreata* y *A. angustifolia*.
5. Identificar el número y localización de los sitios de ADNr clonados de *A. tequilana* en *A. tequilana*, *A. cupreata* y *A. angustifolia*.
6. Elaborar los idiogramas de *A. tequilana*, *A. cupreata* y *A. angustifolia* a partir de los datos obtenidos de la hibridación de los ADNr.

V. FUNDAMENTACIÓN

V.1 Familia Agavaceae

La familia Agavaceae, son plantas monocotiledóneas que se distribuyen tanto en ambientes áridos como semiáridos; ésta se puede dividir en dos subfamilias (Agavoideae y Yuccoideae) y nueve géneros (Cuadro 1). Es una familia endémica del continente americano, se distribuye desde el sur de Canadá hasta Bolivia y Paraguay (incluyendo Centroamérica y las islas del Caribe) (García-Mendoza y Galván, 1995); su presencia en las Islas Galápagos y Bermudas, parece ser por razones antropogénicas (García-Mendoza, 2004). En México se encuentran el 75 % del total de las especies conocidas en la familia (García-Mendoza, 2004), lo que le otorga a México ser el centro de origen, por su mayor riqueza y diversidad de especies.

Cuadro 1. Número total de especies de la familia Agavaceae en México. Modificado de García-Mendoza y Galván, (1995).

Género	Total de especies	Especies en México
<i>Agave</i> ^{1,2}	166	125 (75%)
<i>Manfreda</i> ²	28	27 (96%)
<i>Polianthes</i> ²	13	13 (100%)
<i>Prochnyanthes</i> ²	1	1 (100%)
<i>Furcraea</i>	20	11 (55%)
<i>Beschorneria</i>	7	7 (100%)
<i>Yucca</i>	50	30 (60%)
<i>Hesperoyucca</i>	1	1 (100%)
<i>Hesperaloe</i>	3	3 (100%)
Total	289	218 (75%)

¹ *Agave sensu stricto*

² *Agave sensu lato*

En la actualidad, el origen de la familia no se conoce del todo, pues existen diferentes opiniones sobre la edad estimada de la familia. Algunos reportes mencionan que se originó

hace 37-57 millones de años (Alvarez de Zayas, 1989), sin embargo, esta fecha se modificaría debido a que Palacios y Rzedowski (1993) reportaron la presencia de polen de *Agave* con una edad estimada de 15-25 millones de años; recientemente Good-Avila y col. (2006) mencionan que la familia se originó entre 20-26 millones de años. No obstante de esto, el origen de la familia se ha relacionado con el surgimiento de las zonas áridas en Norteamérica desde mediados del Mioceno (Axelrod, 1979; Briones, 1994). Eguiarte y col. (2000) mencionan que las formas ancestrales de la familia fueron plantas herbáceas perennes, similares a las actuales *Hosta*, que evolucionaron rápidamente hacia formas arborescentes, y de manera secundaria se originaron los géneros herbáceos actuales; a partir de esto, sus especies se diversificaron y ampliaron su distribución gracias a diversos caracteres asociados a la adaptación a ambientes áridos (García-Mendoza, 2004).

Las especies de la familia presentan una gran variación morfológica, pues existen plantas con hojas suculentas y fibrosas, en forma de roseta, con un margen de hoja dentado, denticulado o córneo y una espina apical (*Agave*, *Furcraea*, *Hesperaloe*, *Hesperoyucca* y *Yucca*), las cuales se han adaptado a ambientes secos y altos niveles de radiación solar; en otro grupo, se encuentran hierbas con órganos de reserva subterráneos, hojas con o sin fibras, con un margen entero o finamente denticulado y ápice sin espina terminal (*Beschorneria*, *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes*) (García-Mendoza, 2004); también se presentan biología reproductivas contrastantes, algunas especies son iteróparas (policárpicas), en donde los individuos se reproducen cada año; mientras que otras son semélparas (monocárpicas), se reproducen una sola vez en su vida y después mueren (Eguiarte y col., 2000); sin embargo, comparten algunas características como el tipo de inflorescencia terminal, ya sea espigada o paniculada, con flores bisexuales, frutos capsulares y semillas con fitomelano, que les confiere su característico color negro (García-Mendoza, 2004).

V.2 Género Agave

V.2.1 Taxonomía del género

El nombre del género *Agave* significa “admirable” y fue descrito por Linnaeus en 1753. Se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela incluyendo las islas del Caribe (García-Mendoza, 2002), tal como se ilustra en la Figura 1.



Figura 1. Distribución del género *Agave*. Modificado de García-Mendoza (2002).

El género ha sido objeto de diversos análisis taxonómicos desde su creación por Linnaeus, en donde describe cuatro especies, a partir de esto, se han realizado un sinnúmero de estudios taxonómicos, sin embargo, en la actualidad no existe un consenso para definir a que familia pertenece. En 1841, Endlicher incluye a *Agave* junto a *Furcraea* en la familia Agavaceae, mientras que Bentham y Hooker (1883), y Pax y Hoffman (1930), ubican a *Agave* y géneros emparentados en la familia Amaryllidaceae mientras que a *Yucca* y géneros cercanos los incluyen en la familia Liliaceae. Posteriormente, Hutchinson (1934) lo incluye en la familia Agavaceae junto a otros 18 géneros. En 1959, Hutchinson propone el orden Agavales, formado por las familias Agavaceae y Xanthorrhoeaceae, y otros han ubicado a la familia dentro del orden de Asparagales (Takhtajan, 1980; Dahlgren y col., 1985). En la actualidad, el sistema de clasificación del Grupo de Filogenia de las Angiospermas (APG III, 2009) lo

incluye dentro del orden Asparagales, familia Asparagaceae, subfamilia Agavoideae junto a otros 35 géneros, sin embargo, esta clasificación no ha sido aceptada del todo (Thiede, 2001; Rocha y col., 2006).

El género *Agave* es el más grande dentro de la familia e incluye 166 especies, de las cuales, el 75 % se encuentran en México (García-Mendoza y Galván, 1995; Eguiarte y col., 2000). El género *Agave* es parafilético a *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes* constituyendo un clado de 208 especies (en los cuatro géneros) al que se le denomina *Agave sensu lato*, mientras que al género *Agave* se le conoce como *Agave sensu stricto* (Eguiarte y col., 2000). El género *Agave sensu stricto* se caracteriza por ser monocárpico, poseer hojas fibrosas suculentas y habitar en climas semi-áridos, mientras que los tres géneros incluidos en *Agave sensu lato*: *Manfreda* (28 especies), *Polianthes* (13 especies), *Prochnyanthes* (1 especie), son policárpicos, herbáceos y de climas más templados (Good-Avila y col., 2006). El género *Agave sensu stricto* se ha dividido tradicionalmente en dos subgéneros de acuerdo al tipo de inflorescencia (Gentry, 1982). El subgénero *Littaea*, comprende ocho grupos y presenta una inflorescencia espigada; mientras que el subgénero *Agave* comprende 12 grupos y poseen inflorescencias paniculadas. El subgénero *Littaea* se distribuye desde Estados Unidos hasta Guatemala, excepto Baja California y Yucatán, mientras que el subgénero *Agave* se encuentra desde el sur de Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela, incluyendo el Caribe y Centroamérica (Eguiarte y col., 2000).

V.2.2 Cariotipos del género

Estudios citogenéticos en cromosomas meióticos y mitóticos han confirmado que el número cromosómico básico del género *Agave* es $x = 30$ (Doughty, 1936; Brandham, 1969a; Ruvalcaba-Ruiz y Rodríguez-Garay, 2002), este valor podría pertenecer a un paleopoliploide, un paleopoliploide secundario o haberse originado de un poliploide intragenérico (Pinkava y Baker, 1985). El género presenta diferentes grados de ploidía, y se han reportado especies diploides hasta hexaploides (Banerjee y Sharma, 1987; Castorena-Sánchez y col., 1991; Palomino y col., 2005), los cuales se han determinado por el conteo cromosómico y citometría de flujo.

Las especies del género se caracterizan por un cariotipo bimodal asimétrico y altamente conservado, el cual está compuesto por cinco cromosomas grandes y 25 cromosomas pequeños, los cuales se derivan de un proceso evolutivo llamado ortoselección; este proceso da como resultado un número cromosómico básico uniforme y cariotipos con la misma estructura de cromosomas grandes y pequeños (Brandham y Doherty, 1998).

A la fecha se han descrito los cariotipos de diferentes especies y variedades en el género, los cuales presentan el mismo cariotipo bimodal así como una constricción secundaria en uno de los cromosomas grandes (Palomino y col., 2005; Moreno-Salazar y col., 2007; Palomino y col., 2008; Palomino y col., 2010). Castorena-Sánchez y col. (1991) analizaron los números cromosómicos y la variación cariotípica en cinco diploides y poliploides de *Agave* así como un híbrido interseccional, y encontraron el mismo cariotipo bimodal así como una variación en los tipos de cromosomas. Esta variación intra e inter-específica en los cariotipos de las especies del género también la han reportado Palomino y col. (2005), quienes indicaron la presencia citotipos poliploides estructurales en *A. angustifolia*; Moreno-Salazar y col. (2007) analizaron tres poblaciones silvestres y encontraron dos diferentes citotipos.

V.2.3 Morfología del género

El género *Agave* consiste en plantas perennes, suculentas, en forma de roseta, que florecen tan solo una vez al final de su ciclo de vida, entre 8-20 años, dependiendo de la especie, y después desarrollan una larga inflorescencia. Todas las especies del género se reproducen una sola vez en su vida, por lo que se consideran monocárpicas, mientras que las especies de *Agave sensu lato* como *Manfreda* y *Polianthes* florecen en varias ocasiones, y se consideran policárpicas.

La morfología del género *Agave* se ilustra en la Figura 2, donde se muestra que las hojas crecen en forma de espiral, su forma varía de lineal a lanceolada u ovalada, son gruesas, suculentas y fibrosas, dando lugar a la formación de la roseta. En los bordes de las hojas la mayoría de las plantas tienen dientes córneos que nacen sobre mamilas casi siempre con espina terminal, que les brindan una gran protección contra depredadores y que disminuyen el área de transpiración en las regiones más expuestas a la radiación solar. Tienen raíces fibrosas

superficiales y que se dispersan ampliamente, su fotosíntesis es del tipo metabolismo ácido crasuláceo (CAM), con estomas de apertura nocturna y fijación del carbono en ácidos orgánicos, principalmente ácido málico, aunque algunos son C3 facultativos, poseen cutícula gruesa con cera y la forma de las hojas disminuye el área expuesta a la radiación y dirige el agua hacia el centro de la planta (Gentry, 1982; García-Mendoza, 2007). Las flores son perfectas y se desarrollan en la parte terminal de una larga inflorescencia que en algunas especies llega a alcanzar 10 metros de altura, tiene forma espigada en el subgénero *Littaea* mientras que en el subgénero *Agave* es paniculada (Figura 2); el pedúnculo floral tiene brácteas, con flores protándricas de diferentes grados de succulencia, bisexuales, tubulares, con ovario inferior, poseen seis tépalos de diferentes coloraciones, y seis anteras unidas a estambres más largos que los tépalos y estilos, sus frutos son inferiores, trilobulados, con placenta axial o central (Gentry, 1982; García-Mendoza, 2007).

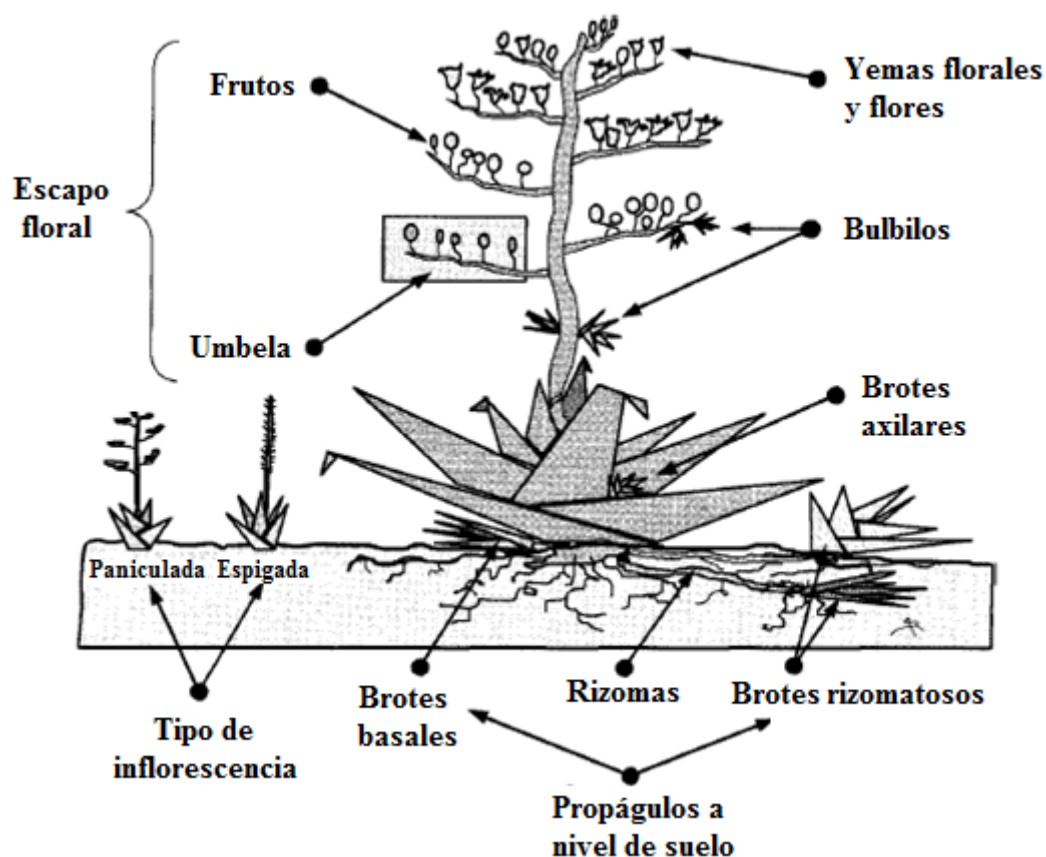


Figura 2. Morfología general del género *Agave*. Modificado de Arizaga y Ezcurra (2002).

V.2.4 Características reproductivas en el género

El género *Agave* se reproduce de manera asexual y sexual, aunque muchas especies dentro del género se propagan por ambos mecanismos. La reproducción asexual se lleva a cabo a través de clones a partir de bulbilos aéreos producidos en el escapo floral, brotes laterales producidos por los meristemas axilares, brotes basales producidos por debajo de la roseta, o hijuelos de rizomas que emergen del suelo a una cierta distancia de la planta madre (Gentry, 1982; Arizaga y Ezcurra, 2002). La reproducción sexual es a través de la producción de semillas; cuando inicia la floración, la planta desarrolla una larga inflorescencia (escapo floral) con flores que producen mucho néctar y polen, como resultado del crecimiento del meristemo apical, y cuyas flores son polinizadas principalmente por murciélagos *Leptonycteris* y *Choeronycteris* en el caso del subgénero *Agave* (Gentry, 1982; Arizaga y col., 2000a, b; Eguiarte y col., 2000), mientras que los insectos como polillas, abejas y abejorros e inclusive colibríes polinizan a las plantas del subgénero *Littaea* (Eguiarte y col., 2000; Slauson, 2000; Silva-Montellano y Eguiarte, 2003). Rocha y col. (2005) mostraron que los murciélagos *Leptonycteris curasoae*, *Choeronycteris mexicana* y *Glossophaga* spp son los principales polinizadores en algunas especies del subgénero *Littaea*. Se ha mencionado que algunas especies no se reproducen de manera sexual, sino sólo a partir de bulbilos derivados de la inflorescencia (Arizaga y Ezcurra, 1995) o inclusive, algunos casos la producción tanto de frutos como de semillas es nula en especies auto-polinizadas (Molina-Freaner y Eguiarte, 2003; Escobar-Guzmán y col., 2008).

V.2.5 Distribución y endemismo del género

En México, las poblaciones naturales de *Agave* habitan prácticamente en todo el territorio nacional, se encuentran desde altitudes de nivel del mar hasta los 3400 m, pero es más común encontrarlos entre 1000-2000 m. Son abundantes en bosques tropicales caducifolios, los bosques espinosos, pastizales, desiertos y chaparrales; no obstante, la mayoría de las especies se encuentran en regiones cálidas-secas así como en bosques templados de pino-encinos y en menor proporción en bosques tropicales siempre verdes, subdeciduos y de niebla. Los tipos de

suelos que favorecen el crecimiento de los agaves son diversos, tanto de origen ígneo como sedimentario, principalmente caliza (García-Mendoza, 2002; García-Mendoza, 2007).

La mayor diversidad de especies de *Agave* en México se encuentra en tres regiones: el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, entre Oaxaca y Puebla, con un clima semiárido (precipitación anual de 400 mm) y una diversidad de comunidades (bosque tropical caducifolio, bosque espinoso y chaparral); el noroeste del país, en la Sierra Madre Occidental, en donde predominan los bosques de coníferas y robles; y el Desierto Chihuahuense, al noreste del país, una zona árida con desiertos y chaparrales, con un clima muy seco, con altas temperaturas en verano y baja precipitación anual (<400 mm) (García-Mendoza, 2002).

V.2.6 Características de las especies de *Agave* en estudio

Las especies estudiadas en este trabajo son *A. tequilana*, *A. angustifolia* y *A. cupreata*, las dos primeras son cultivadas, mientras que la última es silvestre; dichas especies pertenecen al subgénero *Agave*, grupos *Rigidae* (*A. tequilana* y *A. angustifolia*) y *Crenatae* (*A. cupreata*).

El grupo *Rigidae* se caracteriza por sus hojas estrechas, rígidas, tipo espada, de forma irradiada que forman la roseta con panículas de pequeñas brácteas, abiertas, con pocas ramificaciones, verdosas a amarillo pálido. Las flores son poco homegéneas, pero con mucha variación, no obstante de que algunas especies del grupo se identifican claramente, en algunas otras es una tarea muy complicada debido a la variabilidad en las mismas. *A. angustifolia*, se caracteriza por sus tallos largos, hojas angostas extendidas, lineales o lanceoladas, rígidas, fibrosas, planas a cóncavas, de un verde claro a gris glauco; se distribuye en bosques espinosos y selvas bajas caducifolias, desde Costa Rica hasta Tamaulipas, principalmente en Sonora. *A. tequilana*, se caracteriza por hojas lanceoladas, fibrosas, puntiagudas, extendidas, de color azul glauco a verde grisáceo, un tallo reducido y cubierto por las hojas las cuales se encuentran aglomeradas formando una roseta; se distribuye principalmente en pendientes semi-áridas del suroeste de Tequila y en la zona de los Altos de Jalisco, a altitudes de más de 1500 m (Gentry, 1982).

El grupo *Crenatae* se caracteriza por los márgenes de las hojas muy crenados, con dientes muy variados, así como panículas profundas y angostas. Las flores son homogéneas, con un tubo floral que excede el largo de los tépalos, por lo que la clasificación de las especies dentro del grupo es de acuerdo a las características de las hojas. Las hojas son del verde-claro al verde-amarillento, las hojas más jóvenes están cubiertas con un vello glauco, que se acentúa con los patrones impresos de las espinas de hojas anteriores. *A. cupreata*, se caracteriza por una profunda crenación café cobrizo en sus hojas verdes brillantes, lanceoladas o aovadas, con marcas foliares de hojas anteriores; se distribuye en las pendientes montañosas de bosques de pino-encino, pastizales y selvas bajas de la cuenca del río Balsas entre Michoacán y Guerrero, en altitudes de 1200 a 1850 m (Gentry, 1982).

V.3 Poliploidía en plantas

La poliploidía es la posesión de tres o más juegos completos de cromosomas y se considera una de las principales fuentes de diversidad genética y filogenética en la evolución de las angiospermas (Halverson y col., 2008), así como en la domesticación de cultivos como trigo, maíz y algodón (Dubcovsky y Dvorak, 2007). En las plantas, la poliploidía representa un mecanismo de adaptación y especiación muy importante, y se estima que entre el 47 y 70 % de las angiospermas son poliploides. Se clasifican como autopoliploides cuando sus genomas provienen del mismo individuo o especie; mientras que en los alopoliploides, sus genomas provienen de diferentes especies por hibridación interespecífica. No obstante, en algunas ocasiones esta clasificación se vuelve un tanto complicada cuando se relaciona con las diferentes formas de apareamiento cromosómico (Ramsey y Schemske, 1998). Este fenómeno evolutivo se presenta debido principalmente a tres mecanismos: los gametos $2n$ (debido a errores en la meiosis), el doblamiento somático (formación de una célula con el doble de cromosomas, debido a errores en la mitosis) y la polispermia (singamia de múltiples gametos) (Gerstein y Otto, 2009).

Análisis moleculares sugieren que la mayoría de las angiospermas (>90 %) existentes evidencian uno o más eventos de duplicación completa de sus genomas (Leitch y Leitch, 2008). La gran cantidad de genes duplicados encontrados en los genomas de plantas se derivan

de la poliploidía, ya que durante la evolución de estas plantas han ocurrido un sinnúmero de eventos de poliploidización recientes e incluso antiguos en diversos grupos de plantas (Adams, 2007). La poliploidía puede dar como resultado rearrreglos cromosómicos y pérdida de genes (Udall y Wendel, 2006), evolución de interlocus concertada de repeticiones de ADNr (Wendel y col., 1995), diferentes velocidades de evolución de secuencias de genes duplicados (Small y col., 1999), y cambios en la metilación de ADN (Lukens y col., 2006). Parece que muchas, si no es que todas las plantas, poseen al menos un ancestro poliploide en algún momento de su evolución, la cual se asocia con una gran reorganización del genoma tanto a nivel cromosómico como genético (Wolfe, 2001).

Existen cultivos importantes con algún grado de ploidía tales como algodón, trigo, canola, banana, café, tabaco, caña de azúcar, papa y muchos otros (Udall y Wendel, 2006; Brownfield y Köller, 2010).

V.3.1 Efectos genéticos de la poliploidía

A mediados del siglo pasado Stebbins (1950) describió que la poliploidía era “un camino cerrado” en la evolución de las plantas, sin embargo, estudios recientes la han colocado como una importante fuerza evolutiva en las plantas (Bretagnolle y Thompson, 1995; Ramsey y Schemske, 1998; Halverson y col., 2008; te Beest y col., 2011).

El aumento en la poliploidía en las plantas va acompañado de un aumento en el número de alelos por *locus*, esto ha provocado que se tenga la idea de que los efectos nocivos de las mutaciones y/o alelos recesivos son enmascarados por la redundancia genética (Comai, 2005; Ramsey y Schemske, 2002); esta situación puede ser importante cuando se trata de una población pequeña y aislada, y en donde es importante el establecimiento de una población poliploide (Comai, 2005; te Beest y col., 2011). Cuando la población llega a un equilibrio, los beneficios de la protección contra dichos alelos recesivos se ve minimizada por la alta frecuencia de alelos mutantes, es decir, los poliploides sufren más mutaciones nocivas que los diploides (Otto y Whitton, 2000).

La poliploidía también provoca un aumento en la heterocigocidad y heterosis de los individuos; seguido de un evento de alopoliploidización, esta se mantendrá a lo largo de las generaciones debido a que el apareamiento de cromosomas homólogos impide una recombinación intergenómica (Comai, 2005), mientras que en híbridos diploides disminuirán a la mitad en cada generación. También se ha observado una alta heterocigocidad en autotetrapoliploides, que es mayor cuando están presentes tres o cuatro genomas (ABCD), así como aumento de casi el doble del tamaño de la población, en comparación con los diploides, como resultado de la herencia polisómica (Birchler y col., 2003; Parisod y col., 2010). Otra consecuencia de la poliploidía es la diferente expresión génica, ya que la combinación de dos genomas puede dar lugar a la formación de diferentes expresiones génicas comparadas con los progenitores, inclusive puede existir una diferente expresión en órganos y tejidos, donde en algunos casos el gen se expresa de igual manera, en otros aumenta o disminuye, o inclusive puede ser silenciado (Adams y Wendel, 2005; Adams, 2007). Recientemente, se han reportado cambios en la expresión génica en distintas especies poliploides como son *Arabidopsis* y trigo (Comai y col., 2000; He y col., 2003); también se ha encontrado que el silenciamiento génico puede ocurrir desde la primera generación de la poliploidía, aunque algunos genes son silenciados en generaciones posteriores (Wang y col., 2004) y otros después de la poliploidización, pero solamente en algunos órganos de la planta, pues continúan expresándose en varios órganos a diferentes niveles (Adams y col., 2004).

V.3.2 Origen de la poliploidía

Como se mencionó previamente, la poliploidía en las plantas se puede generar a través de distintos mecanismos como son: el doblamiento de cromosomas somáticos, la polispermia y los gametos $2n$.

El doblamiento de cromosomas somáticos se ha observado tanto en tejido meristemático como no-meristemático y en esporofitos adultos. Este mecanismo se presenta tanto en retoños fértiles como en células poliploides de la corteza y médula del tallo, que después de una herida o tumores inician su crecimiento; el doblamiento también ocurre en cigotos o embriones jóvenes dando lugar a la formación de esporofitos poliploides (Ramsey y Schemske, 1998). La

polispermia, es la fertilización de una célula huevo por más de un núcleo espermático, como los casos del girasol y orquídeas y muchos otros ejemplos (Vigfússon, 1970), sin embargo, se considera un mecanismo poco común en la formación de poliploides (Ramsey y Schemske, 1998).

A mediados del siglo XX se tenía la idea de que las especies poliploides se habían generado a través del doblamiento somático, y se consideraba a los gametos $2n$ como una forma poco usual en la formación de poliploides. No es sino hasta después del trabajo de Harlan y deWet en 1975, en donde se reconoce la importancia de los gametos $2n$ en la formación de los poliploides, pues demostraron que la mayoría de las especies producen este tipo de gametos. La formación de este tipo de gametos $2n$, es la causa principal del origen de las especies poliploides de acuerdo a un sinnúmero de reportes (Bretagnolle y Thompson, 1995; Thompson y Lumaret, 1992; Ramsey y Schemske, 1998), por lo que se le dará un tratamiento más amplio que los dos anteriores y antes de iniciar el análisis de las anomalías en la meiosis que dan lugar a la formación de dichos gametos, es importante revisar las características de la misma.

V.3.2.1 Meiosis

Las plantas superiores tienen una vida compleja que alternan entre un organismo esporofítico diploide y una forma gametofítica haploide. La fusión de la célula huevo y la célula espermática da lugar a la formación del cigoto, que es el inicio del esporofito, completando de esta manera su ciclo de vida. La meiosis es un tipo especializado de división celular que da lugar a la formación de gametos en la mayoría de las plantas, animales y hongos; de hecho, la reproducción sexual es una estrategia exitosa en la evolución de los seres vivos (Bell, 1982), esto se debe a que es capaz de recombinar los genomas de dos individuos, lo que incrementa la diversidad genética y hace más eficiente la selección (Rice y Chippindale, 2001).

La meiosis involucra la replicación del ADN y dos divisiones celulares (meiosis I y meiosis II), cada división consta de cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase (Figura 3). Antes de la meiosis, durante la fase S se duplica el ADN celular para formar las cromátidas hermanas e iniciar el proceso. En la profase I, los cromosomas homólogos se aparean, se lleva

a cabo la sinapsis y la recombinación entre ellos, dando lugar a la formación de quiasmas entre cromátides no hermanas de los cromosomas homólogos (bivalentes). En metafase I, los cromosomas se alinean en la placa ecuatorial. En anafase I, los dos cromosomas homólogos de cada uno de los bivalentes se separan y migran hacia los polos opuestos (división reduccional). En la telofase I, los cromosomas se segregan en dos núcleos, los cromosomas se alargan y se hacen difusos y se vuelve a formar la membrana nuclear. La citocinesis puede o no ocurrir en este momento de acuerdo al tipo de citocinesis, sucesiva o simultánea de cada especie. Cada célula hija recibe uno de los cromosomas al final de la primera división, la cual reduce el número de cromosomas a la mitad en cada célula hija. En la segunda división se separan las cromátides hermanas de manera ecuacional y al final del proceso, se forman cuatro células llamadas microsporas con un número haploide de cromosomas (Cai y Xu, 2007; Griffiths y col., 2005). Los gametos maduros (célula huevo y espermias) desarrollados de las células hijas haploides se fusionan, dando lugar a descendencia diploide o poliploide a través de la fertilización. Además de esto, la meiosis genera variación debido a la recombinación y entrecruzamiento que se lleva a cabo en la profase I, por lo que el material genético, tanto del padre como de la madre se “reacomoda” (Cai y Xu, 2007).

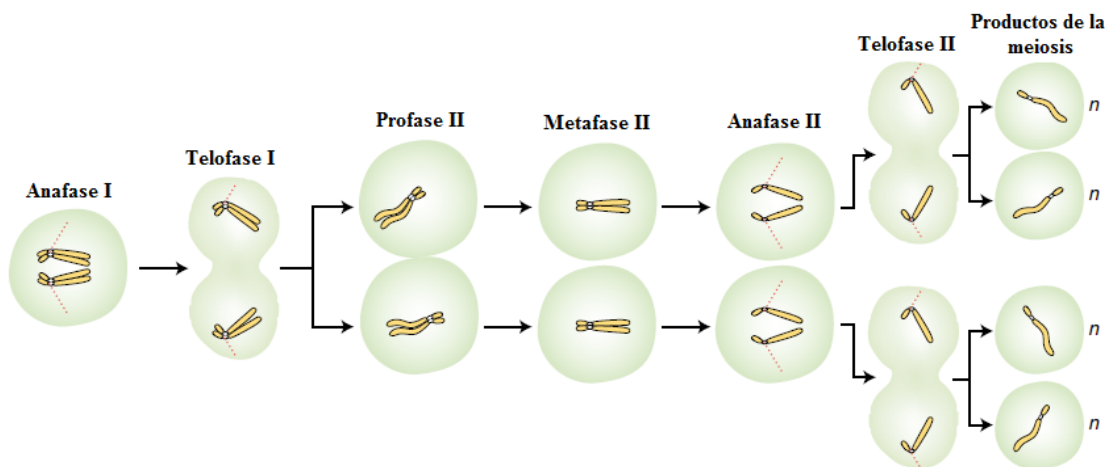


Figura 3. Representación de la meiosis. Modificado de Griffiths y col. (2005).

V.3.2.2 Origen de los gametos $2n$ y sus consecuencias genéticas

Los gametos $2n$, son gametos que poseen un número de cromosomas esporofítico en lugar del gametofítico; la formación de estos gametos se debe por lo general a fallas en la meiosis. El

proceso que da lugar a la formación de este tipo de gametos se conoce como restitución meiótica, y ocurre durante la microsporogénesis y/o megasporogénesis (Ramanna y Jacobsen, 2003). Existen diferentes mecanismos citológicos responsables de la formación de gametos $2n$, los cuales se han estudiado desde tiempo atrás (Veilleux, 1985; Bretagnolle y Thompson, 1995; Ramanna y Jacobsen, 2003); tal es el caso de la papa (*Solanum tuberosum* L.), la cual ha sido una especie modelo en la identificación de las diversas anormalidades que dan lugar a la formación de este tipo de gametos (Quinn y col., 1974; Mok y Peloquin, 1975a; Mendiburu y Peloquin, 1977). Sin embargo, el estudio e identificación de los mecanismos involucrados en la formación de este tipo de gametos en las monocotiledóneas está aún en desarrollo, pues a pesar de haberse identificado dichos mecanismos en algunos géneros como *Alstromeria* (Ramanna y col., 2003), *Lilium* (Lim y col., 2001), *Triticum* (Xu y Joppa, 2000), *Bracharia* (Gallo y col., 2007), *Paspalum* (Pagliarini y col., 1999), todavía faltan un sinnúmero de géneros y especies, en donde la identificación de los mismos facilitaría el entendimiento de cómo se generan estos gametos.

No obstante de que existen diversas anormalidades citológicas que llevan a la restitución nuclear en la meiosis, todas estas se engloban en tres mecanismos conocidos como: Restitución de la Primera División Meiótica (FDR), Restitución de la Segunda División Meiótica (SDR) y Restitución Meiótica Indeterminada (IMR), tal como se muestra en la Figura 4.

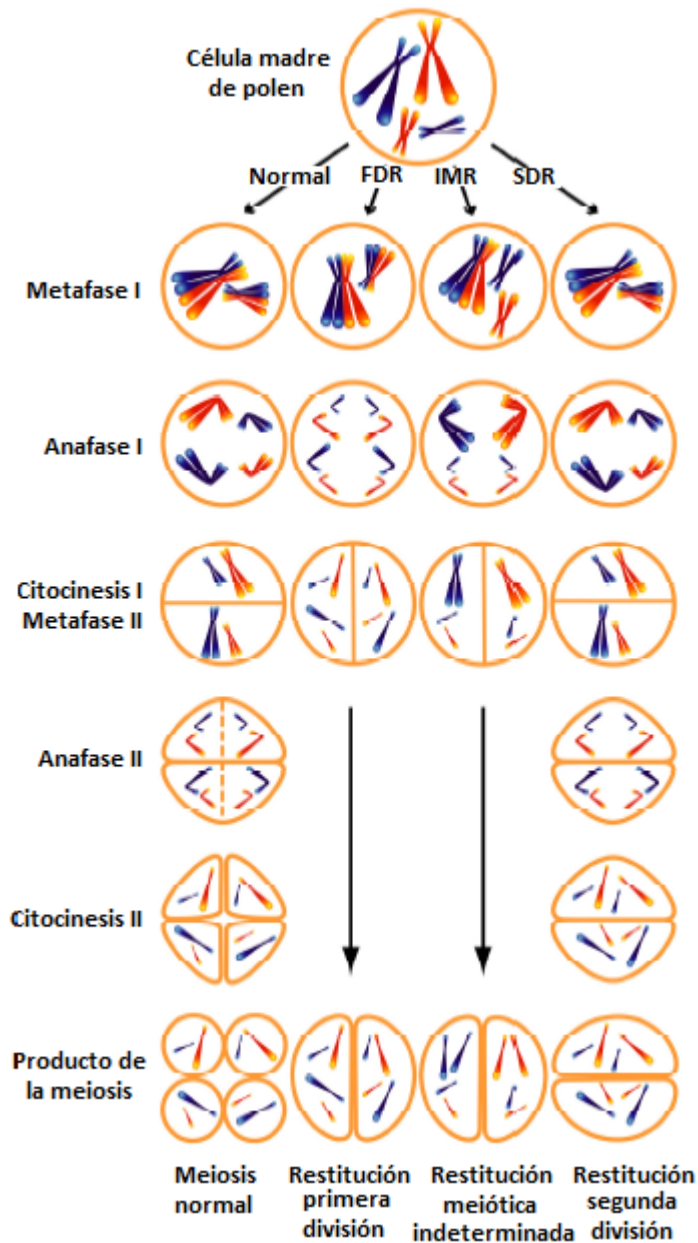


Figura 4. Descripción de los tres mecanismos de restitución nuclear en la microsporogénesis de especies monocotiledóneas con citocinesis sucesiva (Lilis). Modificado de Barba-Gonzalez y col. (2008).

En la FDR los complementos cromosómicos se dividen de manera ecuacional antes de la telofase I, seguida de una citocinesis que da lugar a la formación una diada; al no existir una división posterior, los núcleos se restituyen en cada célula dando como resultado una diada

con dos microsporas $2n$. En el caso de la SDR, la primera división meiótica ocurre normalmente y es seguida por una citocinesis produciendo una diada, las cromátides se dividen y en lugar de continuar con una segunda división, los núcleos se restituyen en ambas células de la diada, lo que genera una diada con dos microsporas $2n$. El tercer mecanismo, IMR, se ha identificado en híbridos inter-específicos del género *Lilium*, el cual combina características de los dos mecanismos antes mencionados, ya que durante la primera división meiótica algunos de los univalentes se dividen de manera ecuacional (como en FDR) y algunos bivalentes se dividen de manera reduccional (como en SDR) antes de la telofase I, dando lugar a la formación de una diada sin una división posterior, por lo que se genera una diada con dos microsporas $2n$ (Lim y col., 2001; Barba-Gonzalez, 2005; Barba-Gonzalez y col., 2008).

Los efectos de la carga génica de los tres mecanismos son diferentes debido a la distinta segregación de los cromosomas. Los gametos originados a través de FDR son idénticos uno del otro, así como en la madre cuando no hay recombinación; pero la presencia de recombinación mantiene la heterocigocidad en los *loci* cercanos al punto de entrecruzamiento cromosómico (Ramanna y Jacobsen, 2003). Los gametos originados por SDR son altamente heterogéneos si la segregación cromosómica es al azar y el gameto está constituido por cromosomas de ambos padres; la región entre el centrómero y el primer punto de entrecruzamiento en cada par permanecen idénticos (homocigotos) mientras que los segmentos distales a dicho punto son heterocigotos (Ramanna y Jacobsen, 2003). En el caso de gametos derivados de IMR tienen el mayor grado de variación genética debido a la segregación al azar de algunos cromosomas como en SDR y la división ecuacional de otros como en FDR, aunque la heterocigocidad distal y proximal se mantiene si hay recombinación (Ramanna y Jacobsen, 2003).

La determinación del mecanismo de restitución en una especie, se puede dilucidar a través de un análisis citológico de la micro y megasporogénesis, aunque esto en ocasiones es más complicado de lo que parece debido a que dependen de diversos mecanismos meióticos como son: el apareamiento cromosómico, la formación de los quiasmas y la citocinesis en la primera división meiótica y anomalías del huso mitótico y la formación de la pared celular en la

telofase II de la segunda división, etc. (Ramanna y Jacobsen, 2003). Otros métodos para elucidar los mecanismos de restitución incluyen el análisis de las dos cromátides en la meiosis (Mok y Peloquin, 1975b) así como marcadores genéticos y moleculares (Bastiaanssen y col., 1999).

V.3.2.3 Detección de los gametos $2n$

En la actualidad existen diversos métodos para la detección de gametos $2n$ en plantas, en donde la mayoría de estas técnicas se enfocan en el polen, ya que es más sencillo de aislar que las células huevo. El polen $2n$ se puede identificar a través de varios métodos como son: el tamaño del polen, el contenido de ADN por citometría de flujo y el análisis de la microsporogénesis (Bretagnolle y Thompson, 1995).

El método más sencillo para detectar la presencia de polen $2n$ en un individuo es a través de la tinción del polen mediante el uso de reactivos tradicionales como acetocarmín o fucsina ácidolactofenol, de esta manera se analiza el rango de los tamaños del polen teñido en un individuo. La presencia de polen más grande se relaciona con el polen $2n$ en muchas especies, ya que el aumento en la cantidad de ADN provoca que el volumen del polen aumente e influya en el diámetro del mismo, por lo que la presencia de polen más grande o gigante, se ha utilizado como indicador de la producción de polen $2n$ en una especie y/o individuo (Yan y col., 1997; Becerra Lopez-Lavalle y Orjeda, 2002; Barba-Gonzalez y col., 2004; DeWitte y col., 2009). Cuando se grafican las frecuencias del diámetro del polen en individuos productores de este tipo de gametos, se observa una distribución bimodal en lugar de una distribución normal (Sala y col., 1989; Orjeda y col., 1990; Crespel y col., 2006). Una desventaja de esta técnica es el amplio traslape en la distribución del tamaño en el polen haploide y diploide como en algunas especies de pastos (Ray y Tokach, 1992; Jansen y Den Nijs, 1993), o que una distribución bimodal se relacione con polen pequeño e inviable y el polen normal (Van Laere y col., 2009).

Un método más directo en la detección de polen $2n$, es la determinación del contenido de ADN nuclear del polen a través de la citometría de flujo. Para determinar el contenido de

ADN en el polen, los núcleos se deben de liberar del mismo y eliminar los restos de pared celular; para esto se han utilizado métodos enzimáticos, químicos, mecánicos u osmóticos en diferentes especies como *Begonia* (DeWitte y col., 2009), *Tulipa* (Okazaki y col., 2005), *Lilium* (Lim y col., 2004), *Rosa rugosa* (Roberts, 2007). Esta técnica compara el contenido de ADN en los núcleos de polen con el contenido de ADN en tejido foliar, lo que supone que el polen n tenga la mitad del contenido de ADN, es decir, (1C), mientras que el polen $2n$ tiene el mismo contenido de ADN que los núcleos del tejido foliar (2C) de la misma planta (DeWitte y col., 2011).

La presencia de mónadas, diadas y triadas encontradas durante el análisis de la microsporogénesis se ha asociado con la presencia de polen $2n$; aunque este análisis provee una alternativa para la detección de polen $2n$, no asegura la viabilidad del mismo, ya que dependen además de la segregación cromosómica y de la maduración posterior del polen (DeWitte y col., 2011). A pesar de este inconveniente, el análisis de la microsporogénesis puede ayudar a identificar el mecanismo de restitución involucrado en la formación de los gametos $2n$, aunque en algunos casos, es más complejo de lo que parece debido a que dependen de varios factores como son el apareamiento cromosómico, la formación de quiasmas y la citocinesis (Ramanna y Jacobsen, 2003), además de que en algunas ocasiones se ha identificado la presencia de diferentes mecanismos citológicos en un mismo individuo (Ferris y col., 1992; Taschetto y Pagliarini, 2003; Zhang y Kang, 2010).

V.3.2.4 Importancia de los gametos $2n$ en el mejoramiento genético

La generación de plantas poliploides mediante el uso de gametos $2n$ se lleva a cabo desde antes del descubrimiento de la colchicina, sin embargo, estas prácticas eran muy ineficientes, pues se realizaban de manera natural en los invernaderos de los agricultores y en muchas ocasiones, las plantas poliploides pasaban desapercibidas. En la actualidad, los gametos $2n$ se utilizan para aumentar el grado de ploidía en cultivos de interés así como una forma de transmitir genes deseables de especies nativas a especies cultivadas (Peloquin y col., 1999; Carputo y col., 2000).

No obstante del conocimiento de los gametos $2n$ en diversos géneros, el uso de este tipo de gametos en programas de mejoramiento ha sido principalmente en papa, alfalfa, rosa y lilis (Mok y Peloquin, 1975a; Mok y Peloquin, 1975b; Crespel y col., 2006; Barba-Gonzalez y col., 2004; Barba-Gonzalez y col., 2005; Tavoletti y col., 1991a; Tavoletti y col., 1991b). Otro caso del mejoramiento genético es el de la caña de azúcar, la cual es un octaploide ($2n = 80$) de origen híbrido. Para mejorar la caña cultivada, denominada caña noble (*Saccharum officinarum*) se cruzó con la especie silvestre *S. spontaneum*. Como resultado se obtuvieron plantas F1 que consistían del complemento somático de *S. officinarum* y un complemento haploide de *S. spontaneum* que se denominó apareamiento $2n+n$. Posteriormente se retrocruzaron los híbridos F1 de *S. officinarum* x *S. spontaneum* con *S. officinarum* y su progenie también fue $2n+n$ (así como $n+n$), en la mayoría de los casos (Ramanna y Jacobsen, 2003). Otros ejemplos del uso de gametos $2n$ en programas de mejoramiento genético son el trébol rojo (Parrot y Smith, 1984), arándano (Lyrene y col., 2003), *Alstroemeria* (Ramanna y col., 2003), *Lilium* (Van Tuyl y col., 2002), cassava (Hahn y col., 1990) y alfalfa (Veronesi y col., 1986).

En el mejoramiento genético se busca maximizar la heterocigocidad de los individuos empleados para fines comerciales (DeWitte y col., 2011); el aumento en la heterocigocidad se puede obtener al incrementar el grado de ploidía de los individuos debido a la presencia de tres o más alelos en un mismo *locus* en comparación con los individuos diploides (Sanford, 1983). La heterocigocidad en los poliploides depende tanto de la heterocigocidad de los padres como del mecanismo de restitución involucrado en la formación de los gametos $2n$; como se mencionó previamente, los gametos $2n$ derivados de FDR con un entrecruzamiento transmiten el 80% de la heterocigocidad de los padres, mientras que un mecanismo FDR sin entrecruzamiento transmite el 100% de heterocigocidad. Por otro lado, un mecanismo SDR transmite solamente el 40% de heterocigocidad, mientras que a través de un mecanismo IMR, la heterocigocidad es más complicada de determinar debido a que es una combinación de ambos mecanismos (FDR y SDR) (Bretagnolle y Thompson, 1995). Los gametos $2n$ derivados de un mecanismo FDR son más importantes en la obtención de híbridos heterocigotos, mientras que, cuando se desea fijar una característica en un cultivo, se hace uso de gametos $2n$ derivados de un mecanismo SDR debido a la homocigocidad de los mismos.

El desarrollo de cultivos sin semillas es un gran mercado comercial y económico, que desea frutos sin semillas, por lo que se ha utilizado el principio de las plantas triploides en el desarrollo de este tipo de cultivos como las sandías, mandarinas y plátanos (Olsen, 2006). Estos cultivos se pueden obtener a través de dos métodos: el primero de ellos, es el desarrollo de plantas tetraploides, lo que facilita las retrocruzas con sus parentales diploides y da como resultado la obtención de plantas triploides; el segundo método, es la obtención de cultivos triploides en un solo paso, como en el género *Citrus*, en donde los híbridos triploides se recuperan de las hibridaciones sexuales de cruza $2x-2x$ y $2x-4x$, derivados de la unión de megagametofitos $2n$ con polen haploide (Aleza y col., 2010). El uso de estos métodos en plantas ornamentales es muy limitado, pues existen muy pocos ejemplos del uso de triploides en programas de mejoramiento, con la excepción del desarrollo de varios cultivares triploides de la rosa de sharon (*Hibiscus syriacus* L.) (Egolf, 1981; Egolf, 1986; Egolf, 1988).

V.4 Secuencias repetitivas

El genoma de las plantas está constituido por secuencias de genes de bajo número de copias y secuencias regulatorias que constituyen un bajo porcentaje del total de ADN nuclear, mientras que el mayor porcentaje del genoma corresponde a secuencias repetitivas de ADN (Kubis y col., 1998). Las secuencias repetitivas de ADN se dividen en dos grandes grupos, de acuerdo a su organización genómica y localización en los cromosomas. Un grupo corresponde a aquellas secuencias que se repiten de manera consecutiva, es decir, forman unidades en tándem, en donde las copias individuales son adyacentes unas a otras y se encuentran por lo general en regiones pericentroméricas, subteloméricas, teloméricas o intercaladas en los cromosomas; el segundo grupo corresponde a secuencias que se encuentran dispersas a lo largo del genoma (Kubis y col., 1998) y que se utilizan como marcadores moleculares debido a que son una parte importante en los genomas de la mayoría de las plantas (Heslop-Harrison, 2000). Se ha encontrado que en especies de importancia económica una gran proporción de su genoma son secuencias repetidas, por ejemplo, en el arroz sus secuencias repetidas son el 50% de su genoma; en el maíz el 78%, trigo 83%, cebolla 95% y el centeno 92% (Flavell y col., 1974).

Las secuencias repetitivas cambian rápidamente durante eventos evolutivos (Evans y col., 1983) y son constantemente homogeneizadas dando origen a secuencias que son específicas a ciertos géneros, especies e inclusive a ciertos cromosomas. Consecuentemente, las secuencias repetitivas son fuentes de marcadores moleculares que son muy útiles en estudios de genética vegetal (Hemleben, 1993), pues han sido aisladas en varios géneros y se han utilizado en estudios filogenéticos como en *Actinidia* (Crowhurst y Gardner, 1991), *Sorghum* (Hoang y col., 1991), *Phleum* (Cai y Bullen, 1994), *Cucumis* (Zentgraf y col., 1992) o en programas de mejoramiento genético mediante introgresión en *Beta* (Schmidt y Heslop-Harrison, 1996), *Alstroemeria aurea* × *A. inodora* (Kamstra y col., 1999), *Musa* (D'Hont y col., 2000) y *Lilium* (Van Tuyl y col., 2005).

V.4.1 ADN ribosomales 5S y 45S

Los ADNr en plantas consisten del 45S (18S, 5.8S y 26S) y 5S; en las levaduras estos genes se encuentran co-localizados en el mismo *locus*, mientras que en eucariotas superiores están organizados en familias de arreglos en tándem de las unidades de repetición localizados en uno o varios sitios cromosómicos (Lavania y col., 2005; Garcia y col., 2009).

Los genes del 45S de ARNr se encuentran organizados en arreglos en tándem de las unidades de repetición del 18S, 5.8S y 26S, de los espaciadores internos transcritos (ITS) y de los espaciadores externos no-transcritos (NTS), con un tamaño aproximado de 7.5-18.5 Kb (Mizuochi y col., 2007). Los genes del 5S de ARNr también se presentan en un alto número y en arreglos en tándem, y generalmente independientes del 45S de ADNr, sin embargo, la co-localización del 5S y 45S de ADNr se ha reportado en algunas angiospermas como *Silene chalconica* (Siroky y col., 2001) y *Artemisia* spp. (Garcia y col., 2007); la unidad de repetición del 5S es de 0.2-0.9 Kb, con una región altamente conservada (120 pb de longitud) y separada de un espaciador externo no transcrito (NTS) (Specht y col., 1997) (Figura 5). El número de repeticiones por genoma va del rango de <1000 a >100 000, y así como otras familias de repeticiones, las copias de los ADNr pueden sufrir una evolución concertada debido a las fuerzas de homogenización, lo que da como resultado que las secuencias de todas

las copias sean prácticamente idénticas dentro de las especies, aunque existe cierta divergencia en los genes ortólogos en diferentes especies (Liu y col., 2003).

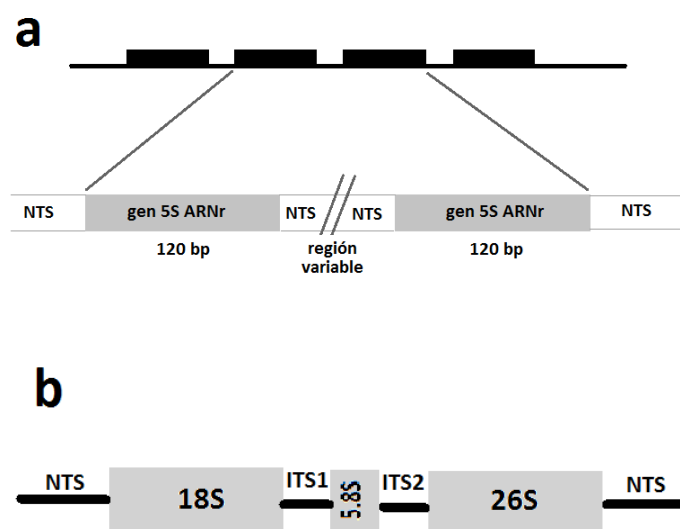


Figura 5. Representación de las unidades de repetición de los genes del 5S (a) y 45S (b) de ADNr, tomado de Pinhal y col. (2008) y Pathogenic Fungi Database (PFDB).

Las secuencias del 5S y 45S de ADNr se han descrito físicamente en diversas especies, y su distribución y número de copias en el genoma difieren en las distintas especies (Li y Arumuganathan, 2001). Estas secuencias son altamente conservadas, por lo que pueden ser empleadas como marcadores moleculares en la mayoría de las especies eucariotas como *Triticum* spp. (Jiang y Gill, 1994); *Gossypium hirsutum* (Ji y col., 1999); *Anoplotrupes stercorosus* (Colomba y col., 2004); *Hordeum vulgare* cv. ‘Plaisant’ (Cuadrado y Jouve, 2010).

V.5 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una herramienta muy útil en la citogenética de plantas para el mapeo físico de familias multigénicas (Mukai y col., 1991) y secuencias de ADN en cromosomas de plantas (Rayburn y Gill, 1985). El uso de la FISH en el estudio de las plantas se inició a partir del trabajo de Rayburn y Gill (1985), en donde marcaron una

secuencia específica de centeno (clon pSc 119) en cromosomas metafásicos de trigo; a partir de esto, la técnica ha sido empleada en el mapeo de familias multigénicas (Mukai y col., 1991), secuencias de ADN sobre cromosomas (Rayburn y Gill, 1985), mapeo de inserciones transgénicas (Kato y col., 2006), retroelementos (Lamb y Birchler, 2006), grupos de genes (Valdivia y col., 2007), inserciones de transposones (Yu y col., 2007), la identificación de cromosomas individuales (Brown y col., 1999; Hizume y col., 2002; Koo y col., 2004; Kato y col., 2004), y en la organización del genoma y evolución en plantas (Jiang y Gill, 1994). Debido a que los genes de los ADNr son altamente conservados, han sido ampliamente utilizados como marcadores moleculares debido a su alto número de copias de unidades de repetición, posiciones específicas en los cromosomas y secuencias altamente conservadas (Liu y Davis, 2011) en muchas especies eucariotas como son *Triticum* spp. (Jiang y Gill, 1994), *Gossypium hirsutum* (Ji y col., 1999), *Anoplotrupes stercorosus* (Colomba y col., 2004) y *Hordeum vulgare* cv. 'Plaisant' (Cuadrado y Jouve, 2010).

Mediante el uso de FISH se ha podido determinar cómo las secuencias repetitivas dispersas en *Gossypium*, específicas del genoma A en los genomas diploides, han colonizado el genoma D de los poliploides (Hanson y col., 1998); también se ha observado que el número de *loci* de los sitios 5S y 45S de ADNr pueden cambiar en los alopoliploides, como en *Sanguisorba* (Rosaceae), donde Mishima y col. (2002) reportaron que los sitios duplicados de 5S de ADNr fueron eliminados después de la poliploidización, mientras que en el poliploide *Zingiber trichopoda* (Poaceae), ocurrió lo contrario, pues se observó que los sitios del 45S fueron eliminados (Kotseruba y col., 2003). La FISH también se ha utilizado en el análisis de especies poliploides y estudios filogenéticos en *Lupinus* (Naganowska y Zielinska, 2002), durante la domesticación y evolución de *Vigna unguiculata* (Galasso y col., 1998), *Paeonia* (Zhang y Sang, 1999), *Nicotiana* (Lim y col., 2000) y *Tragopogon* (Pires y col., 2004) mediante el uso de sondas de ADN repetitivo.

VI. METODOLOGÍA

Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ), en la ciudad de Guadalajara, Jalisco entre los años 2009-2012. La metodología experimental que se utilizó en el presente trabajo se describe a continuación. De manera breve, se realizó el análisis de la microsporogénesis en botones florales de *A. tequilana* var. ‘Azul’ y *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ y ‘Cimarrón’ para identificar los mecanismos de restitución involucrados en la formación de gametos $2n$ así como las anormalidades que ocurren en la meiosis; también se llevo a cabo el análisis morfológico de polen para determinar la frecuencia de polen $2n$ en ambas especies. Por otro lado, se amplificaron los genes 5S y 18S de ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’ y se clonaron en *Escherichia coli* DH5 α , éstos se emplearon junto con los ADNr de trigo en la hibridación *in situ* fluorescente en las especies *A. tequilana* var. ‘Azul’, *A. cupreata* y *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ y ‘Cimarrón’. A partir de los datos obtenidos de la FISH, se elaboraron los cariotipos de las especies de *Agave* estudiadas.

VI.1 Materiales

VI.1.1 Microorganismos

Los microorganismos empleados fueron la cepa de *Escherichia coli* DH5 α como vector en la clonación de los ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’ así como los clones pTa71 y pTa794 de *E. coli*, los cuales poseen las secuencias del 45S y 5S del ADNr de trigo, donados por el Dr. Hans de Jong del Departamento de Genética de la Universidad de Wageningen en los Países Bajos.

VI.1.2 Plásmido/Vector

pGEM-T Easy (Promega, Madison, USA)

Es un vector linearizado con una timidina en 3’ en ambos extremos, lo que previene su recircularización y facilita la inserción de productos de PCR (Figura 6). Es un vector de alto número de copias que posee los promotores T7 y SP6 de la polimerasa de ARN que flanquean

la región múltiple de clonación dentro de la región codificante del α -péptido de la β -galactosidasa, lo que permite la identificación de colonias recombinantes.

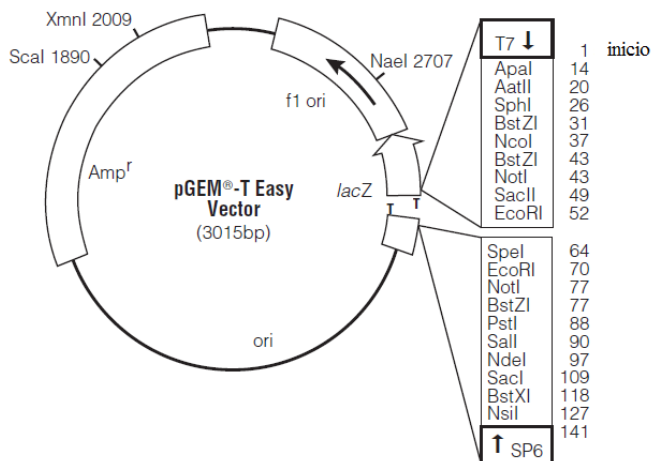


Figura 6. Mapa del vector pGEM-T Easy.

VI.1.3 Material vegetal

Para el análisis de los mecanismos de restitución meiótica en las especies del género *Agave*, se emplearon los botones florales de *A. tequilana* var. ‘Azul’ y *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ y ‘Cimarrón’. Los botones florales se colectaron en el año 2010 en la Zona de Denominación de Origen del Tequila para *A. tequilana* var. ‘Azul’ (CIATEJ, Jalisco, 20° 41' 39" N; 103° 20' 47" W) y en el Municipio de Toluimán, Jalisco (19° 32' 06" N; 103° 53' 44" W) para *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ y ‘Cimarrón’.

Para la obtención de los cariotipos se utilizaron tres plantas de tres especies y dos variedades del género *Agave*: *A. cupreata* (Miraval, Guerrero, 17° 43' 00" N; 99° 45' 00" W), *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ y ‘Cimarrón’ y *A. tequilana* var. ‘Azul’. Las plantas se colectaron en la Zona de Denominación de Origen del Tequila para *A. tequilana* var. ‘Azul’, en el Municipio de Toluimán, Jalisco para *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ y ‘Cimarrón’ y en Miraval, Municipio de Teloloapan, Guerrero para *A. cupreata*. Las plantas se colocaron en macetas de

plástico que contenían una mezcla de turba:arena:vermiculita (3:3:1) y se mantuvieron en invernadero a una temperatura promedio de 28 °C y una humedad relativa promedio de 40 %.

VI.1.4 Reactivos y soluciones químicas

Los reactivos químicos y soluciones empleadas en este trabajo se describen en el Anexo 1.

VI.2 Métodos

VI.2.1 Determinación de mecanismos de restitución

VI.2.1.1 Análisis de la microsporogénesis

Para realizar el análisis de la microsporogénesis, los botones florales se recolectaron en diferentes etapas de desarrollo, se fijaron en etanol:ácido acético (3:1) al menos durante 12 h y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Antes del análisis de la microsporogénesis, los botones florales se clasificaron de acuerdo al tamaño para determinar la etapa meiótica en que se encontraban las células madre de polen (CMP). Posteriormente, se extrajeron las anteras de los botones florales y se enjuagaron con agua bidestilada durante 15 min. Se colocaron en un portaobjetos y se maceraron en una gota acetorceína al 1 %. Al final, se colocó un cubreobjetos para su observación al microscopio Leica DMRA2 (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemania). En los botones maduros se contabilizó el número de diadas, triadas, tétradas y otras microsporas presentes, mientras que en los botones inmaduros se analizó la meiosis así como cualquier anomalía presente.

VI.2.1.2 Ocurrencia y frecuencia de polen $2n$

El polen maduro se tiñó con acetorceína al 1 % para determinar su diámetro y calcular el promedio del mismo, y a partir de éste, la frecuencia de polen $2n$. Cuando el diámetro de los granos de polen era 1.2-1.4 veces el tamaño promedio del polen n (Quinn y col., 1974), se consideró como polen $2n$. El polen se fotografió con una cámara Evolution QEi Camera

(Media-Cybernetics, Bethesda, USA) acoplada al microscopio Leica DMRA2 (Leica Microsystems GmbH) y el diámetro del mismo se determinó con el programa Image-Pro (Media-Cybernetics). La viabilidad del polen se evaluó con la tinción de azul de anilina al 1 % en lactofenol (Hauser y Morrison, 1964), en donde el polen viable con características esféricas e íntegro, se tiñó de azul, mientras que el polen no viable, encogido y deforme, permaneció incoloro.

VI.2.2 Mapeo físico del 5S y 45S de ADN ribosomal (ADNr) de trigo y *Agave*

VI.2.2.1 Clonación de las secuencias de ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’

VI.2.2.1.1 Extracción de ADN genómico de *A. tequilana* var. ‘Azul’

Para la extracción del ADN genómico se colectaron hojas jóvenes de *A. tequilana* var. ‘Azul’, utilizando el método de CTAB. Se molieron 4 g de tejido (hojas) de *A. tequilana* var. ‘Azul’ en un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido. Las hojas molidas se transfirieron a un tubo de 50 ml y se añadieron 4 ml de buffer de extracción CTAB-PVP al 2 % a 65 °C, se agitó hasta obtener una suspensión viscosa. Se incubaron durante 20-30 min en baño maría y posteriormente se añadió un volumen similar (5 ml) de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se extrajeron por rotación durante 20 min a temperatura ambiente; los tubos se centrifugaron durante 30 min a 3600 rpm y el sobrenadante se transfirió a tubos de 15 ml. Se añadió 0.1 volúmenes de buffer de CTAB al 10 % a 65 °C y se mezcló cuidadosamente. Se añadió un volumen similar (4 ml) de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se extrajeron nuevamente por rotación a temperatura ambiente durante 20 min, se centrifugó a 3600 rpm durante 30 min y el sobrenadante se transfirió a otro tubo de 15 ml. Se adicionó un volumen similar de buffer de precipitación de CTAB al 1 % y el ADN se precipitó invirtiendo el tubo varias veces. Los tubos se centrifugaron durante 3 min a 3600 rpm y se eliminó el sobrenadante, la pastilla de ADN se resuspendió en 1.5 ml de buffer TE alto en sales a 65 °C en un baño maría. Se agregaron 2 veces el volumen (3 ml) de etanol al 96 % previamente enfriado en hielo y se centrifugó a 3600 rpm durante 3 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante, se adicionó a la pastilla de ADN 3 ml de etanol al 80 % y se mezcló cuidadosamente. Los tubos se

centrifugaron a 3600 rpm durante 3 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. La pastilla de ADN se secó en un horno a 37 °C durante 4 h, se resuspendió en 100 µl de buffer TE 0.1 y se agregó 1µl de RNasa A. Para determinar la concentración de ADN, se midió en un espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) a una longitud de onda de 260 nm y la calidad del ADN extraído se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1 % en amortiguador TAE 1X y con bromuro de etidio a 85 Voltios durante 50 min. Posteriormente, se visualizó en un fotodocumentador Gel Doc XR+ System (Bio-Rad, Hercules, USA) y se consideró de calidad aquéllas muestras que mostraban una banda intensa y con un poco de barrido.

VI.2.2.1.2 Amplificación de las secuencias de ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’

Para el diseño de los iniciadores, se realizó una búsqueda en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para identificar secuencias homólogas al inicio y al final de los genes reportados en otras especies que pudieran ser utilizadas como iniciadores para la amplificación de los genes de ADNr 5S, 5.8 S, 18S y 26S de *A. tequilana* var. ‘Azul’. Se diseñaron varios iniciadores con variaciones mínimas como se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Iniciadores empleados en la amplificación de los ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’.

ADNr	Forward	Reverse
5S	F1: 5'-CAC CAG ATC CCA TCA GAA CT-3' F2: 5'-CAC CGG ATC CCA TCA GAA CT-3'	R1: 5'-TTA GTG CGT GTA TGA TCG CA-3' R2: 5'-TTA GTG TTG GTA TGA TCG CA-3' R3: 5'-TTA GTC TGG TAT GAT CGC AC-3'
5.8S	F1: 5'-GAG AGA CCG CGA ACC TGT AA-3'	R1: 5'-CCT CCC CGT ACG GAG CAC G-3' R2: 5'-CCT CCC TGT ACG GAG CAC G-3' R3: 5'-CCT CCC CAT ACG GAG CAC G-3' R4: 5'-CCT CCT CTT ACG GAG CAC G-3'
18S	F1: 5'-CAA AGA TTA AGC CAT GCA TG-3'	R1: 5'-CCC AGA ACA TCT AAG GGC AT-3' R2: 5'-TTC CTC TCA ATG ATA AGG TT-3'
26S	F1: 5'-TAT CAA TAA GCG GAG GAA AA-3'	R1: 5'-CGT GGC AGC AAG GCC ACT CT-3'

Los iniciadores fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (Coralville, USA). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen de 20 µl que contenían: 5.2 µl de H₂O mQ, 2µl de *Taq* buffer 10x, 1 µl de MgCl₂ 50 mM, 1.6 µl de dNTPs 2.5 mM, 2 unidades de *Taq* polimerasa (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA), 2.5 µl de cada iniciador 1 mM y 50 ng de ADN (5µl). Las reacciones se realizaron en tubos de 0.2 ml en un termociclador TC-4000 Techne (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Inglaterra). Las condiciones de reacción así como el número de ciclos en la amplificación de los genes de ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’ se detallan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Condiciones de reacción empleadas en la amplificación de los ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’.

ADNr	5S	5.8S	18S	26S
Desnaturalización inicial	94 °C / 4 min	94 °C / 5 min	94 °C / 5 min	94 °C / 5 min
Número de ciclos	35	35	35	35
Desnaturalización	94 °C / 30 seg	94 °C / 30 seg	94 °C / 30 seg	94 °C / 30 seg
Alineación	55 °C / 30 seg	60 °C / 40 seg	60 °C / 30 seg	60 °C / 30 seg
Extensión	72 °C / 30 seg	72 °C / 90 seg	72 °C / 90 seg	72 °C / 120 seg
Extensión final	72 °C / 10 min	72 °C / 10 min	72 °C / 10 min	72 °C / 10 min

La amplificación de las secuencias de los ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’ por PCR se corroboraron mediante la electroforesis en geles de agarosa al 1 % en amortiguador TAE 1X y con bromuro de etidio a 85 Voltios durante 50 min. Posteriormente, los geles se visualizaron en un fotodocumentador Gel Doc XR+ System (Bio-Rad). Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb plus (Life Technologies Corporation) para determinar los tamaños de los productos de la PCR.

VI.2.2.1.3 Purificación de los fragmentos de ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’

Los fragmentos amplificados de los ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’ se extrajeron del gel de agarosa con una navaja, se colectaron en un tubo eppendorf y se purificaron con el kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del

fabricante. La concentración de los fragmentos purificados se midió en un espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific) a una longitud de onda de 260 nm y se verificó el tamaño de los fragmentos purificados por electroforesis en geles de agarosa al 1 % en amortiguador TAE 1X y con bromuro de etidio a 85 Voltios durante 50 min y visualizados en un fotodocumentador Gel Doc XR+ System (Bio-Rad), usando como marcador de peso molecular de 1 Kb plus (Life Technologies Corporation). Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su uso.

VI.2.2.1.4 Ligación del inserto

La ligación de los fragmentos de ADN_r de *A. tequilana* var. 'Azul' al vector pGem-T Easy, se realizó con el kit pGem-T Easy Vector System I (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se realizó una mezcla con 5 µl de buffer de ligación rápida 2X, 1 µl del vector pGem-T Easy (50 ng), 1 µl (25 ng) del inserto (producto de la PCR), 1 µl de T4 ADN ligasa y 2 µl de agua estéril libre de nucleasas. La solución se mezcló por pipeteo y se incubó toda la noche a 4 °C.

VI.2.2.1.5 Células electrocompetentes *Escherichia coli* DH5α

Para obtener bacterias electrocompetentes se preparó medio líquido Luria-Bertani (LB); se inocularon 50 µl de *E. coli* DH5α en 30 ml de medio LB líquido y se incubaron a 37 °C durante toda la noche en un agitador orbital (190-200 rpm). Posteriormente, se midió la densidad óptica (DO_{600}) = Absorbancia (A^0) y se diluyó hasta alcanzar una $DO_{600} = 0.1 A^0$ en 200 ml. Posteriormente, el cultivo se incubó a 37 °C hasta que alcanzó una $DO_{600} = 0.6-0.8$, y se distribuyó equitativamente en tubos de 100 ml y se centrifugó durante 12 min a 10,000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en tres ocasiones en 100 ml de agua destilada estéril a 4 °C. Después del tercer lavado la pastilla se resuspendió en 2 ml de agua destilada estéril y se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 ml (1 ml en cada tubo). Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 13,000 rpm a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de glicerol al 10 %. Se hicieron alícuotas de 80 µl en tubos eppendorf de 200 µl y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

VI.2.2.1.6 Transformación

La transformación de *E. coli* DH5 α con el vector pGem-T Easy con los fragmentos de ADN_r ligados, se realizó mediante la técnica de electroporación. En una celda de 0.1 cm, se agregaron 70 μ l de células competentes de *E. coli* DH5 α y 2 μ l de la ligación, se aplicó una descarga eléctrica de 1.8 KV por algunos milisegundos (pulso) en el MicroPulser (Bio-Rad). Las células se recuperaron en 900 μ l de medio SOC a 37 °C por 1 h con agitación constante a 200 rpm. Las células se colectaron por centrifugación a 13,000 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular (pastilla) en 100 μ l de H₂O estéril. Las células se sembraron en cajas Petri con medio LB sólido (15 g/l de bactoagar) adicionado con 200 μ g/ml de ampicilina como antibiótico de selección, así como 20 μ l (20 mg/ml) del cromógeno X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) y se incubaron a 37 °C durante 20 h.

VI.2.2.1.7 Verificación de la presencia de las secuencias de ADN_r de *A. tequilana* var. 'Azul' y aislamiento de colonias transformadas

El análisis de las colonias transformadas se realizó primeramente, aislando las colonias blancas con un palillo estéril, con el cual se picaron y se sembraron en cajas de medio LB sólido adicionado con 200 μ g/ml de ampicilina y 20 μ l (20 mg/ml) del cromógeno X-Gal e incubadas a 37 °C durante 20 h. Al mismo tiempo, se analizó la presencia de las secuencias clonadas por PCR bajo las condiciones de reacción utilizadas en el apartado VI.2.2.1.2; para ello se utilizó el mismo palillo el cual se aplastó en un tubo eppendorf de 200 μ l y se mezcló con la mezcla de reacción de PCR. La transformación de las colonias se corroboró con el tamaño de los fragmentos separados por electroforesis de gel de agarosa al 1 % y mediante su visualización en el fotodocumentador. Las colonias positivas a la transformación se picaron con un palillo estéril, se sembraron en 4-5 ml de medio LB líquido adicionado con 200 μ g/ml de ampicilina y se incubaron durante 20 h a 37 °C con agitación constante a 200 rpm. Finalmente, una parte del cultivo de las colonias transformadas se almacenó en el cepario del Laboratorio de Biotecnología Vegetal a -80 °C y a la otra parte se extrajo el ADN plasmídico (ADN_p).

VI.2.2.1.8 Aislamiento de plásmidos

La extracción del ADNp de las colonias transformadas con las secuencias de los ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’ y los clones pTa71 y pTa794 de *E. coli*, se realizó con el kit High Pure Plasmid Isolation (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y a partir del cultivo inoculado del apartado anterior (VI.2.2.1.7). Una vez obtenidos los plásmidos purificados, se determinó la concentración del ADNp en un espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific) a una longitud de onda de 260 nm.

VI.2.2.1.9 Secuenciación y edición de los fragmentos de ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’

Una vez aislados los clones recombinantes con los fragmentos de ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’, se enviaron a secuenciar al LANGEBIO (CINVESTAV, Irapuato). A partir de las secuencias de dichos fragmentos amplificadas de ADNr, se utilizó el programa Bioedit 7.0.9 para evaluar la calidad de dichas secuencias, revisando cada electroferograma, y en donde la calidad no era la adecuada, se asignaba de manera manual la base correcta. Posteriormente, se realizó un blastn en la base de datos de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), el cual permitió confirmar la amplificación de las secuencias de ADNr deseadas.

VI.2.2.2 Hibridación *in situ* fluorescente con ADNr de trigo y *Agave*

VI.2.2.2.1 Preparaciones cromosómicas

Los ápices radiculares de tres plantas de *A. tequilana* var. ‘Azul’, *A. cupreata* y *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ y ‘Cimarrón’, se colectaron temprano por la mañana, se pre-trataron con una solución saturada de α -bromonaftaleno (0.1 %) y se colocaron en agua de hielo durante 24 hr. Posteriormente, las raíces se fijaron en una solución de etanol:ácido acético (3:1) durante al menos 12 h y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Los ápices radiculares se enjuagaron en agua mQ durante 15 min y se colocaron en buffer de citrato (10 mM ácido cítrico + 10 mM citrato tri-sódico, pH 4.5) durante 30 min; se incubaron en una mezcla de enzimas pectinolíticas

que contenía 0.2 % (p/v) de pectoliasa Y23 (Sigma, USA), 0.2 % (p/v) de celulasa Onozuka RS (Yakult, Japón) y 0.2 % (p/v) de citohelicasa (Sigma) en buffer de citrato a 37 °C durante 2 h en una cámara húmeda. Los ápices (1-3 mm) se maceraron en una gota de ácido acético al 45 %, se aplastaron con el cubreobjetos y se sumergieron en nitrógeno líquido. Los cubreobjetos se removieron con una navaja de rasurar y las preparaciones se deshidrataron en etanol absoluto y secadas al aire. Las mejores placas se almacenaron a 2-3 °C durante 1 mes.

VI.2.2.2 Sondas marcadas de ADNr

En este trabajo se utilizaron como sondas: el clon pTa71, el cual contiene el fragmento *EcoRI* del 45S de ADNr de trigo (9 Kb) (Gerlach y Bedbrook, 1979), el clon pTa794, el cual contiene el fragmento *BamHI* del 5S de ADNr de trigo (410 pb) (Gerlach y Dyer, 1980), y los fragmentos sintéticos del 5S (191 pb y 436 pb) y el 18S (1424 bp) de ADNr de *A. tequilana* var. 'Azul'. Las sondas se marcaron con biotina-16-dUTP o con digoxigenina-11-dUTP por nick translation o con fluoresceína-12-dUTP por marcaje directo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics GmbH).

Marcaje indirecto por nick-translation

El marcaje por nick-translation se realizó de la siguiente manera: se disolvió 1 µg de ADNp en 16 µl de agua mQ, se agregaron 4 µl de Biotin- o Dig-Nick Translation Mix, se mezcló y centrifugó brevemente. Se incubó durante 90 min a 15 °C y la reacción se detuvo al agregar 1 µl de EDTA (ácido etil-diamino-tetra-acético) 0.5 M (pH 8.0) y calentar durante 10 min a 65 °C.

Marcaje directo con fluoresceína-12-dUTP

El marcaje directo con fluoresceína se realizó de la siguiente manera: se disolvió 1 µg de ADNp en 12 µl de agua mQ, se agregaron 4 µl del mix del fluoróforo para marcaje 5X y 4 µl del Nick Translation Mix, se mezcló y centrifugó brevemente. Se incubó durante 90 min a 15

°C y la reacción se detuvo al agregar 1 µl de EDTA (ácido etil-diamino-tetra-acético) 0.5 M (pH 8.0) y calentar durante 10 min a 65 °C.

VI.2.2.2.3 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Las preparaciones cromosómicas se incubaron con RNasa A (100 µg/ml) disuelta en SSC 2X durante 1 h en una cámara húmeda a 37 °C, se lavaron durante 15 min en SSC 2X y se incubaron durante 2 min en HCl 0.01 M. Posteriormente, se incubaron en pepsina (5 µg/ml) disuelta en HCl 0.01 M durante 10 min en una cámara húmeda a 37 °C. Las placas se lavaron en agua mQ durante 2 min; luego, se lavaron durante 10 min en SSC 2X y se incubaron en paraformaldehído al 4 % durante 10 min a temperatura ambiente. Las placas se lavaron durante 10 min en SSC 2X y se deshidrataron secuencialmente en etanol al 70 % frío, 90 % y absoluto durante 3 min en cada paso y secadas al aire. La hibridación se realizó utilizando una mezcla de hibridación que consistía de SSC 20X, formamida, dextrán sulfato sódico al 50 %, dodecil sulfato de sodio al 10 %, 25-50 ng/placa de cada sonda. La mezcla se desnaturalizó durante 10 min a 70 °C y posteriormente se colocó en hielo durante al menos 10 min. A cada placa se agregaron 40 µl de la mezcla de hibridación y se desnaturalizaron durante 5 min a 80 °C en un calentador de placas; después, las placas se colocaron en una cámara húmeda y se hibridaron durante toda la noche a 37 °C.

Posteriormente, las placas se lavaron a 37 °C en SSC 2X durante 15 min y luego se incubaron durante 30 min en SSC 0.1X a 42 °C; las placas se lavaron durante 3 min en SSC 2X y se enfriaron de 5-10 min. Después, las placas se lavaron durante 10 min en SSC 2X a temperatura ambiente. Las placas se lavaron en buffer 1 durante 5 min; se agregaron 200 µl de blockbuffer a cada placa y se cubrieron con un cubreobjetos de plástico y se incubaron durante 5 min. Los anticuerpos se diluyeron en 100 µl de blockbuffer por placa de acuerdo al Cuadro 4. El blockbuffer se eliminó de las placas y se agregaron los anticuerpos diluidos, se colocó un cubreobjetos y se incubaron durante 1 h a 37 °C en una cámara húmeda.

Cuadro 4. Dilución de los anticuerpos para la detección por fluorescencia.

Tinción	Verde (DAPI)	Rojo
Marcaje	Dig-11-dUTP -20°C	Biotina-16-dUTP -20°C
1ª Detección	1-5µl anti-Dig-FITC (oveja)	0.4µl estreptavidina- CY3
2ª Detección	1µl anti-oveja-FITC (conejo) +4°C	4µl biotinilada anti- estreptavidina (cabra)
3ª Detección	1µl anti-conejo- FITC (cabra) +4°C	0.4µl estreptavidina- CY3

Las sondas marcadas con biotina se detectaron con estreptavidina-CY3 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) o con el conjugado estreptavidina-Alexa Fluor 546 (Life Technologies Corporation) y la amplificación se realizó con antiestreptavidina de cabra biotinilada (Vector Laboratories, Burlingame, USA) en ambos casos. Las sondas marcadas con digoxigenina se detectaron con antidigoxigenina-fluoresceína (Roche Diagnostics GmbH) y se amplificaron con fluoresceína anti-oveja y fluoresceína anti-conejo (Vector Laboratories). Las placas se lavaron en buffer 1 durante 15 min a 37 °C y posteriormente se realizó la 2ª y 3ª detección (se inicia en el uso del blockbuffer).

Finalmente, las placas se lavaron 2-3 min en SSC 2X a temperatura ambiente. Los cromosomas se contratiñeron con 100 µl de una solución de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) a una concentración de 1 µg/ml, se cubrieron con un cubreobjetos de plástico y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Se lavaron las placas en SSC 2X durante 2-3 min, se drenaron y se agregó una gota de Vectashield (Vector Laboratories), cubriéndolas con un cubreobjetos. Se eliminó el exceso de Vectashield de las placas con papel filtro y se observaron en un microscopio Leica DMRA2 (Leica Microsystems GmbH) equipado con epi-fluorescencia y acoplado a una cámara Evolution QEI (Media-Cybernetics). Las imágenes se analizaron con el programa Image-Pro (Media-Cybernetics) y mejoradas con Photoshop (Adobe Systems Incorporated, USA). Las placas se analizaron al momento y se almacenaron protegidas de la luz a 4 °C durante 2-3 semanas.

VII. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados en dos secciones de acuerdo al objetivo general planteado en este trabajo; la primera, se refiere a los mecanismos de restitución meiótica involucrados en la formación de polen $2n$ en las especies de *Agave* y la segunda al mapeo físico de las especies del género con los ADN ribosomales.

VII.1 Determinación del mecanismo de restitución involucrado en la formación de polen $2n$ en las especies de *Agave*

VII.1.1 Análisis de la microsporogénesis

VII.1.1.1 Microsporogénesis

El inicio de la microsporogénesis en *A. tequilana* var. 'Azul' y *A. angustifolia* var. 'Lineño' y 'Cimarrón' se identificó con la deposición de una pared de calosa alrededor de cada una de las células madre de polen (CMP) o microsporocitos, para posteriormente iniciar la meiosis (Figura 7a). Se observó una microsporogénesis del tipo sucesiva en ambas especies, característica del género, en donde inmediatamente después de la telofase I se formó una pared ecuatorial de calosa, conocida como la etapa de diadas y que inicia desde el centro del microsporocito hacia la periferia del mismo, es decir, de manera centrífuga, separando las células hijas y dando origen a una diada (Figura 7b). Después de la telofase II se llevó a cabo una segunda citocinesis, también de manera centrífuga, por lo que al finalizar la meiosis, se observó la formación de tétradas, principalmente tetragonales, aunque también se pudieron observar otros tipos de tétradas como decusadas, lineales, en forma de T y tetrahédricas (Figura 7c-d).

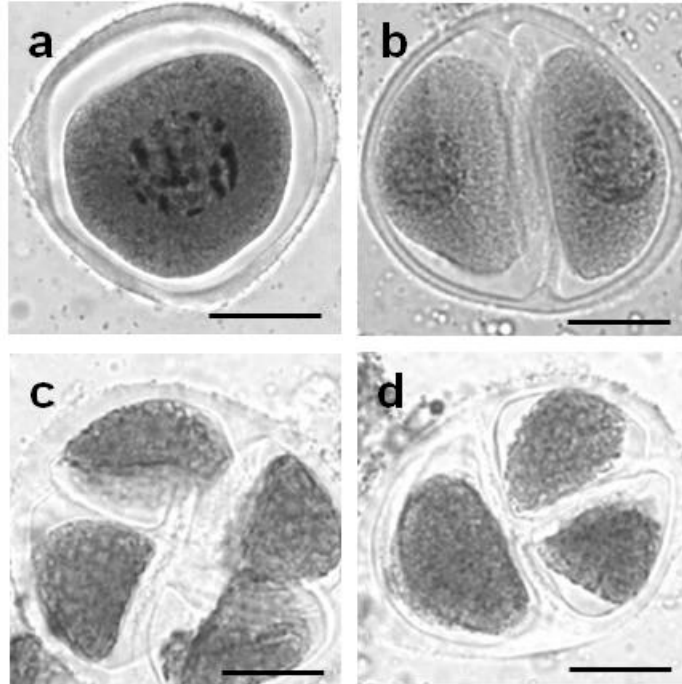


Figura 7. Microsporogénesis sucesiva en *A. tequilana* var. ‘Azul’ y *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ y ‘Cimarrón’. **a** Inicio de la microsporogénesis, con la deposición de una pared de calosa. **b** Una vez que se llevó a cabo la citocinesis I, se formó una diada. **c-d** Tétrada tetragonal y decusada, respectivamente, presentes en las especies del género *Agave*. **a, c, d**, *A. angustifolia*; **b**, *A. tequilana* var. ‘Azul’. Barras = 20 µm.

La microsporogénesis en las especies *A. tequilana* var. ‘Azul’ y *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ y ‘Cimarrón’ fue del tipo sucesivo y ambas divisiones meióticas fueron de manera centrífuga, en virtud de que el surco de división celular iniciaba desde el centro del meiocito hacia la periferia del mismo. Estas características observadas en las especies de *Agave*, son propias de las Asparagales “superiores” como lo han reportado Furness y Rudall (1999) y Penet y col. (2005), y que concuerdan con los trabajos realizados en otras especies de la familia Agavaceae, como son *Polianthes* spp, *Yucca agavoides*, *Beschorneria yuccoides*, *Arthropodium cirrhatum* G.Benn y *Hosta* spp, las cuales poseen el mismo tipo de microsporogénesis sucesiva, tétradas tetragonales y asociadas, así como la formación de la pared celular de forma centrífuga (Penet y col., 2005; Penet y col., 2007; Serrano-Casas y col., 2011). Piven y col. (2001) reportaron una citocinesis sucesiva en *A. fourcroydes* y *A. angustifolia*, con tétradas principalmente en forma de T, lo cual por un lado, confirma el tipo

de citocinesis aquí reportada, sin embargo, el principal tipo de tétradas que ellos mencionan es contrario a lo reportado en otras especies de la familia Agavaceae (Furness y Rudall, 1999; Penet y col., 2005; Penet y col., 2007).

VII.1.1.2 Asincronía de la microsporogénesis

El estudio de la microsporogénesis se realizó en las especies *A. tequilana* var. ‘Azul’ y *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ y ‘Cimarrón’. Se observó que ambas especies poseen una inflorescencia abierta con una maduración acropétala (Figura 8a), así como un desfase de la microsporogénesis como se observa en la Figura 8b, en donde una de las células de la diada está en anafase I (punta de flecha) y la otra en metafase I; este desfase en el desarrollo de la microsporogénesis no sólo se presenta entre las flores de una misma panícula, en donde los botones florales maduran en diferentes tiempos, sino también entre las anteras de una misma flor y entre la base y el ápice de una misma antera; ésta última viene dada por una diferenciación acrópeta, es decir, la base de la antera madura más pronto que el ápice.

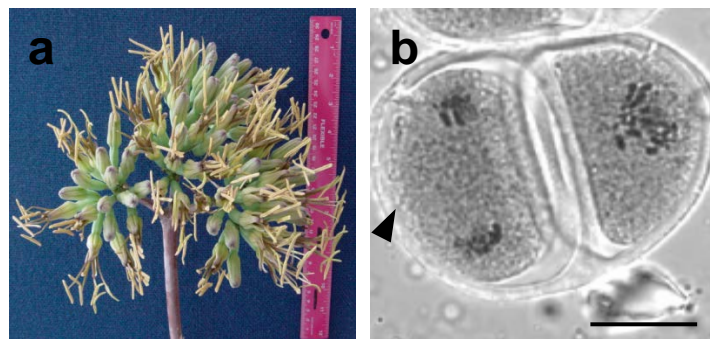


Figura 8. Asincronía de la microsporogénesis en *A. angustifolia*. **a** En la panícula se observan botones florales que maduran a diferentes tiempos. **b** Desfase de la meiosis, en donde una de las células de la diada está en anafase I (punta de flecha) mientras que la otra célula está en metafase I. Barra en **b** = 20 μ m.

La meiosis masculina ocurre en una gran cantidad de células ó microsporocitos que se dividen de manera sincronizada para asegurar la fertilidad del organismo; la sincronización de las células en división es importante en la efectividad de la reproducción sexual, sin embargo, los

mecanismos moleculares y genéticos de este proceso no se han dilucidado completamente (Magnard y col., 2001). En las especies de *Agave* se observó una maduración acropétala de la inflorescencia que es característica del género, ya que al ser una inflorescencia abierta, implica que la maduración de la misma inicia en la parte baja y continua hacia la parte superior de la inflorescencia con flores en todas las etapas de desarrollo (Arizaga y col., 2000a; Piven y col., 2001); sin embargo, el hecho de que en las anteras de una misma flor e inclusive en la misma antera se presente una asincronía es un proceso inusual, debido a la importancia de la sincronización de las células en división. En la actualidad, se sabe que esta sincronización puede ser afectada por factores ambientales como la temperatura (Magnard y col., 2001), e inclusive se ha visto que factores genéticos como los genes *TAM* (*Tardy Asynchronous Meiosis*), *ASK1* (*Arabidopsis SKP1-like*), *AtDMC1* y *DYAD* en *Arabidopsis* provocan un retraso y una asincronía en la división celular en la meiosis, lo cual da como resultado una esterilidad casi completa en los mutantes *ask1-1*, *dyad* y *dmc1*, no así en el mutante *tam*, el cual posee una cierta fertilidad (Yang y col., 1999; Couteau y col., 1999; Siddiqi y col., 2000; Magnard y col., 2001). Esta asincronía en las especies del género *Agave*, no afectó el desarrollo del polen y aunque todos los meiocitos completaban su meiosis, en *A. tequilana* var. ‘Azul’ la viabilidad del polen fue mucho menor que en *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ y ‘Cimarrón’, por lo que esta anomalía así como la presencia de puentes cromosómicos, cromosomas retrasados, micronúcleos, entre otras anomalías, pudieron ser la causa del alto porcentaje de polen no viable en *A. tequilana*, no así en las dos variedades de *A. angustifolia*.

VII.1.1.3 Anormalidades en la microsporogénesis

Durante el análisis citológico de las células madre de polen (CMP), se pudieron observar diversas anomalías tanto en *A. tequilana* var. ‘Azul’ como en *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ y ‘Cimarrón’. Dentro de estas anomalías se observaron células con uno o varios puentes cromosómicos (Figura 9a); células con uno o más fragmentos acéntricos (Figura 9a); células con cromosomas retrasados (Figura 9b) tanto en anafase I como anafase II con diferentes frecuencias; células con micronúcleos en telofase I (Figura 9c) en *A. angustifolia* var.

‘Lineño’, los cuales derivaban de los cromosomas retrasados y/o fragmentos acéntricos que no lograron llegar a los polos, y que presentaban un diferente contenido cromosómico.

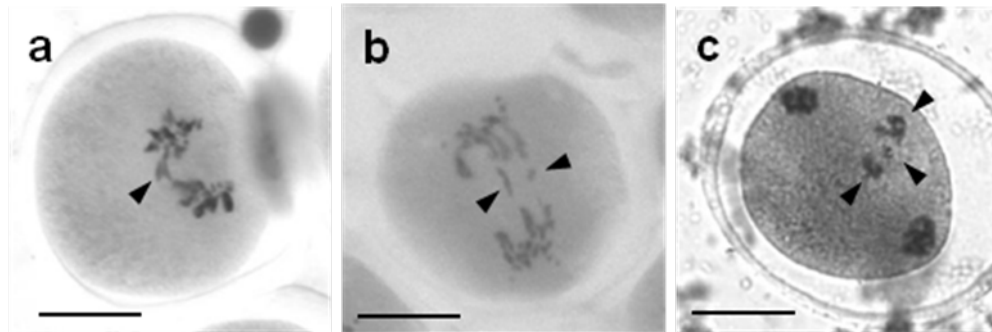


Figura 9. Anormalidades meióticas observadas en *A. tequilana* var. ‘Azul’ y *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ y ‘Cimarrón’. **a** Formación de un puente cromosómico y un fragmento acéntrico en la misma célula (punta de flecha). **b** Cromosomas retrasados en el centro de la célula (puntas de flechas). **c** Tres micronúcleos con diferente contenido cromosómico (puntas de flechas). Barras = 20 μ m.

El análisis de la meiosis en el género *Agave* inició con los estudios de McKelvey y Sax (1933) y desde entonces se han descrito distintas anormalidades en el género (Vignoli, 1936; Doughty, 1936; Cave, 1964; Brandham, 1969a). La presencia de puentes cromosómicos en *A. tequilana* var. ‘Azul’ y *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ y ‘Cimarrón’ se han reportado también en otras especies del género *Agave* (Doughty, 1936; Cave, 1964; Brandham, 1969a). Estos puentes se deben principalmente a inversiones paracéntricas heterocigóticas (Brandham, 1969b) o debido al rompimiento y fusión de cromátides (Newman, 1966). Wang y col. (2010) mencionan que las irregularidades en el apareamiento cromosómico favorece la producción de cromosomas retrasados y micronúcleos; sin embargo, la ausencia de cromosomas retrasados en *A. tequilana* var. ‘Azul’ y *A. angustifolia* var. ‘Cimarrón’ se puede interpretar como que los cromosomas retrasados se unieron a los demás cromosomas en los polos al final de la anafase, no así en *A. angustifolia* var. ‘Lineño’, en donde se observaron micronúcleos con diferente contenido cromosómico, los cuales derivaban de cromosomas retrasados o del rompimiento de los puentes en diferentes puntos (Imery-Buiza, 2007). Este tipo de anormalidades se han observado también en otras especies como *A. vera* (Imery-Buiza, 2007), en híbridos

intergenéricos de la familia Cactaceae (Tel-Zur y col., 2005) y en *Citrus* spp. (Del Bosco y col., 1999), entre otras.

VII.1.1.4 Ausencia de la citocinesis en la meiosis II

Además de las anormalidades antes mencionadas, se pudo observar la presencia de mónadas, diadas y triadas así como otros productos de la meiosis (Cuadro 5). Las mónadas y triadas se observaron en ambas especies, mientras que las diadas sólo se observaron en *A. tequilana* var. 'Azul' y *A. angustifolia* var. 'Lineño'. Las frecuencias de mónadas y diadas fue mayor en *A. angustifolia* var. 'Lineño', mientras que la frecuencia de triadas fue mayor en *A. angustifolia* var. 'Cimarrón'.

El análisis de la meiosis permitió identificar el origen de las mónadas, diadas y triadas encontradas. En el análisis citológico se observaron células de *A. tequilana* var. 'Azul' y *A. angustifolia* var. 'Lineño' que presentaban una primera división meiótica normal, sin embargo, posteriormente ocurría una falla en la citocinesis de la segunda división, lo que generaba diadas binucleadas (Figura 10a), las cuales restituían sus núcleos para dar lugar a la formación de diadas y triadas (Figura 10b-c). Las diadas se generaban por la ausencia de la citocinesis en ambas células de la diada y daban lugar a la formación de dos microsporas $2n$ (Figura 10b,g), mientras que las triadas se formaban por la ausencia de la citocinesis en una de las células de la diada, lo que daba lugar a la formación de una microspora $2n$ y dos microsporas n (Figura 10c,h). Las mónadas se originaron debido a la falla en las citocinesis de ambas divisiones meióticas, por lo tanto, el contenido de cada una de estas células era $4n$.

Cuadro 5. Frecuencias observadas de triadas, diadas, mónadas y polen $2n$ en dos especies de *Agave*.

Especie	Total CMP	Tétradas No. y (%)	Triadas No. y (%)	Diadas No. y (%)	Mónadas No. y (%)	Polen $2n$ (%)
<i>A. tequilana</i> var. 'Azul'	1758	1688 (96)	18 (1)	34 (2)	18 (1)	3.2
<i>A. angustifolia</i> var. 'Lineño'	3430	3274 (95.5)	8 (0.2)	104 (3)	44 (1.3)	2.0
<i>A. angustifolia</i> var. 'Cimarrón'	736	725 (98.5)	8 (1.1)	-	3 (0.4)	1.2

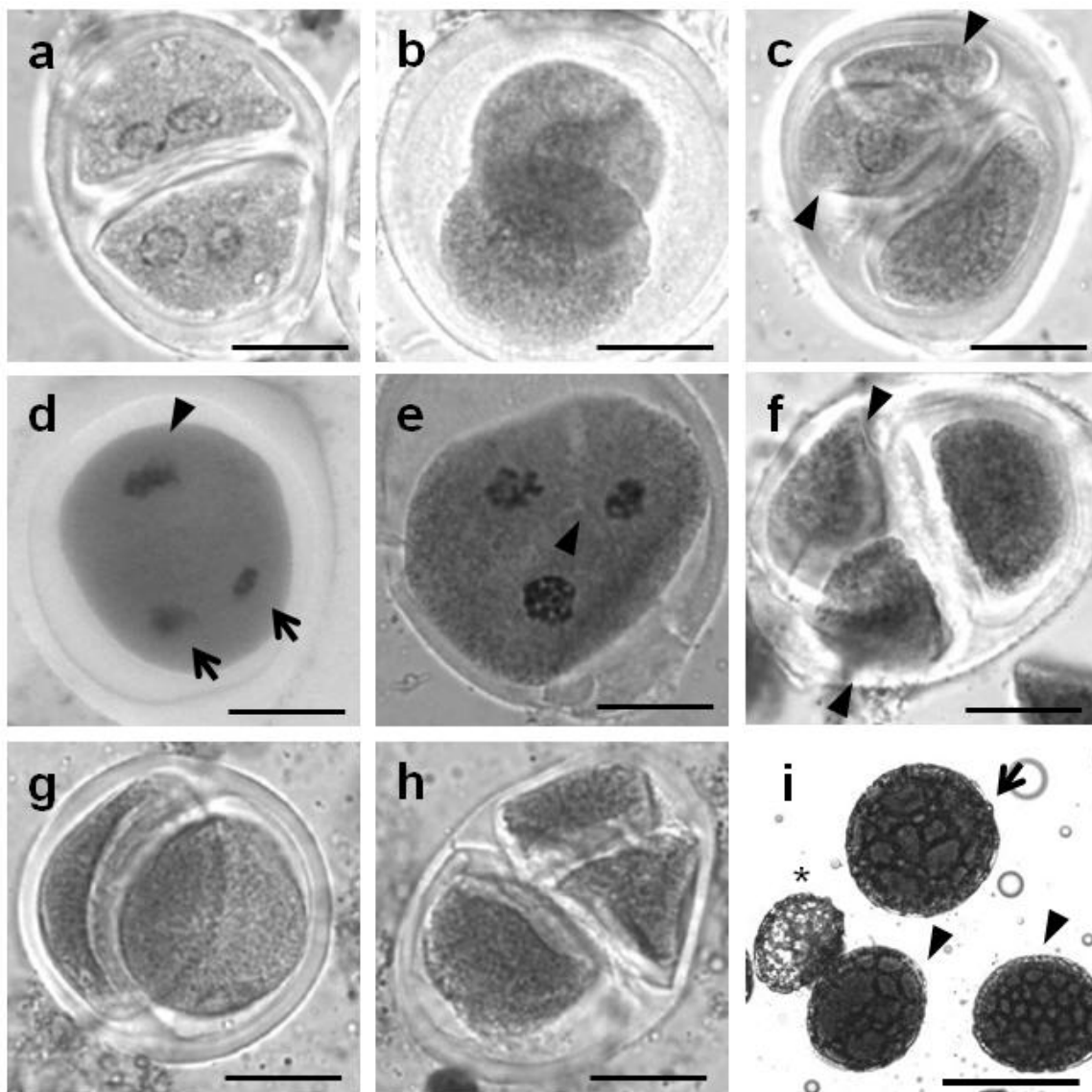


Figura 10. Mecanismos de restitución meiótica en *A. tequilana* var. ‘Azul’ y *A. angustifolia* var. ‘Lineño y ‘Cimarrón’. **a** Diada con dos microsporas binucleadas en *A. angustifolia* var. ‘Lineño’. **b** Diada con dos células $2n$ en *A. angustifolia* var. ‘Lineño’. **c** Triada en *A. angustifolia* var. ‘Lineño’, con dos células n (puntas de flecha) y una célula $2n$. **d** Formación de un núcleo restituido $2n$ (punta de flecha) y dos núcleos n (flechas), debido a un plano de división perpendicular en uno de los complementos cromosómicos en *A. angustifolia* var. ‘Lineño’. **e** Inicio de la citocinesis en telofase I (punta de flecha), etapa siguiente a la mostrada en d. **f** Triada en *A. angustifolia* var. ‘Lineño’, con dos células n (punta de flecha) y una célula $2n$, etapa siguiente a la mostrada en e. **g-h** Diada y triada encontradas en *A. tequilana* var. ‘Azul’. **i** Polen $2n$ (flecha), polen n (puntas de flecha) y polen estéril (asterisco) en *A. tequilana* var. ‘Azul’. Barras: **a-h** = 20 μm ; **i** = 100 μm .

La citocinesis es la separación del citoplasma de una célula en división, después de que su genoma duplicado se ha dividido en dos para dar lugar a la formación de dos células hijas. En las plantas se han observado dos tipos principales de citocinesis meiótica, en maíz y otras monocotiledóneas, la citocinesis se presenta después de cada división celular (citocinesis sucesiva); mientras que en las dicotiledóneas como *Arabidopsis*, la citocinesis se presenta hasta después de la telofase II (citocinesis simultánea) (Nacry y col., 2000). Una falla en la citocinesis de la primera o segunda división meiótica puede dar lugar a la restitución nuclear, y por lo tanto, a la formación de gametos $2n$. La ausencia de la citocinesis en la segunda división meiótica en *A. tequilana* var. ‘Azul’ y *A. angustifolia* var. ‘Lineño’, dio lugar a la formación de diadas y triadas; si la ausencia de la citocinesis se presentaba en ambas células de la diada, se generaban dos núcleos restituidos y por ende, dos gametos $2n$; sin embargo, si la falla se presentaba sólo en una de las células de la diada, se producía una triada con dos gametos n y un gameto $2n$. Este tipo de comportamiento en las especies de *Agave* se reportó también en *Brachiaria brizantha*, una especie monocotiledónea, en donde también se pudo observar la presencia de diadas y triadas, que posteriormente daban lugar a la formación de gametos $2n$ (Risso-Pascotto y col., 2003). Un caso diferente a los mencionados previamente se encontró en *Brachiaria humidicola*, en donde los meiocitos que no realizaban la primera citocinesis reagrupaban sus juegos de cromosomas y generaban un núcleo restituido, pero también se

observaron husos mitóticos tripolares en anafase II que generaban núcleos restituidos, y que al final dieron lugar a la formación de gametos $2n$ (Boldrini y col., 2006). Otras especies en donde se ha reportado la producción de gametos $2n$ debido a fallas en la citocinesis I y/o II incluyen *Paspalum* (Pagliarini y col., 1999), *Solanum* spp. (Werner y Peloquin, 1987), *Lolium* (Wagenvoort y Den Nijs, 1992) y *Medicago* (Pfeiffer y Bingham, 1983).

VII.1.1.5 Falla en el huso mitótico

Otro mecanismo en la formación de las triadas en *A. angustifolia* var. 'Lineño', fue a través de células que presentaban una anafase I anormal, y que después de la división reduccional de los bivalentes y la separación de los cromosomas homólogos, se observó un plano de división perpendicular en uno de los complementos cromosómicos, el cual era dividido de manera ecuacional (Figura 10d), lo que daba lugar a la formación de dos núcleos n y un núcleo $2n$ en telofase I (Figura 10e); posteriormente, se presentaba una citocinesis (Figura 10e) para dar lugar a la formación de una triada (Figura 10f), con la formación de dos microsporas n y una microspora $2n$. En general, en las especies estudiadas, las frecuencias de diadas y triadas fueron de 0-3 % y de 0.2-1.1 %, respectivamente, mientras que la frecuencia de mónadas fue de 0.4-1.3 % (Cuadro 5). La presencia de este tipo de microsporas indicó la existencia de algún mecanismo de restitución en las especies estudiadas.

Una parte importante de la meiosis y del proceso de división celular, está relacionada con la correcta segregación de los cromosomas, lo cual se debe a la aparición y/o formación de manera adecuada del huso mitótico (Jiang y col., 2009). La anomalía observada en *A. angustifolia* var. 'Lineño', involucra la aparición de un huso mitótico anormal en uno de los complementos cromosómicos una vez que se ha llevado a cabo la anafase I, lo cual daba lugar a la formación de células trinucleadas en telofase I, que seguido de una citocinesis, daba lugar a la formación de triadas. Las triadas derivadas de este mecanismo están compuestas de dos microsporas n y una microspora $2n$, las primeras provienen de la división ecuacional de uno de los núcleos debido al huso mitótico anormal, y la segunda de la restitución del otro núcleo. Como se pudo observar, el incorrecto funcionamiento del huso mitótico dio lugar a la

formación de gametos $2n$, lo cual no se había reportado en las especies de *Agave*; estas anomalías del huso mitótico se encuentran entre los principales mecanismos en la producción de gametos $2n$ en plantas (Taschetto y Pagliarini, 2003). Estas anomalías en el huso mitótico se han reportado tanto en metafase I como en metafase II (Bretagnolle y Thompson, 1995) y en la actualidad se conocen tres tipos principales de anomalías en la geometría del huso mitótico: husos mitóticos paralelos, tripolares y fusionados (de Souza y col., 1999). Estas anomalías ocurren en la segunda división meiótica y son causa frecuente de la formación de polen $2n$ en las dicotiledóneas, ya que en la segunda división meiótica, la célula todavía comparte el citoplasma; este mecanismo se ha reportado en muchas especies como *Zea mays* (Clark, 1940), *Agropyrum cristatum* (Tai, 1970), *Carthamus tinctorius* (Carapetian y Rupert, 1977), *Fuchsia* (Tilquin y col., 1984), *Brassica napus*, *Brassica campestris* (de Souza y col., 1999), *Pfaffia glomerata*, *Pfaffia tuberosa* (Taschetto y Pagliarini, 2003), *Arabidopsis thaliana* (Jiang y col., 2009). En el caso de las especies de *Agave*, que es una monocotiledónea, esta falla se presenta en la anafase I, previo a la citocinesis. Esta anomalía observada en *Agave* es muy diferente a las ya mencionadas, donde el huso mitótico anormal aparece inmediatamente después de la reducción de los bivalentes y divide de manera ecuacional uno de los complementos cromosómicos.

VII.1.2 Ocurrencia y frecuencia de polen $2n$

Debido a la presencia de microsporas $2n$ presentes en el análisis citológico, se realizó el análisis morfológico del polen, el cual mostró la presencia de granos de polen de tamaños heterogéneos en casi todas las plantas analizadas tanto en *A. tequilana* var. 'Azul' como en *A. angustifolia* var. 'Lineño' y 'Cimarrón' (Figura 10i). Se observó una viabilidad del 42 % en *A. tequilana* var. 'Azul', mientras que en *A. angustifolia* var. 'Lineño' fue del 99 % y en *A. angustifolia* var. 'Cimarrón' del 91 %; el tamaño del polen varió muy poco su promedio en las dos especies, en *A. tequilana* var. 'Azul' se observó un rango de 65-139 μm y un promedio de $93.2 \pm 11 \mu\text{m}$; para *A. angustifolia* var. 'Lineño' un rango de 65-135 μm y un promedio de $90.9 \pm 6 \mu\text{m}$, mientras que para *A. angustifolia* var. 'Cimarrón', un rango de 70-155 μm y un promedio de $89 \pm 7 \mu\text{m}$, respectivamente. La frecuencia de polen $2n$ observado por planta tuvo un rango de 0-5.8 %; en *A. tequilana* var. 'Azul' se observaron plantas con un porcentaje de 0-

5.8 %, con un promedio de 3.2 %; en *A. angustifolia* var. 'Lineño' un porcentaje de 1.1-3.1 %, con un promedio de 2.0 %, mientras que en *A. angustifolia* var. 'Cimarrón' un porcentaje de 0-2.2 %, con un promedio de 1.2 % (Cuadro 5).

Las anomalías observadas en las dos variedades de *A. angustifolia* no tuvieron un efecto importante en la viabilidad del polen, debido a que ambas presentaron porcentajes mayores al 90 %, lo cual se debe probablemente a que dichas anomalías no fueron tan severas, y no afectaron el desarrollo normal del polen; en el caso de *A. tequilana* var. 'Azul', el cual tuvo una viabilidad del 42 %, sus anomalías fueron probablemente más severas, por lo que, disminuyeron la viabilidad del polen, aunque también pudieran estar involucrados otros mecanismos en la alta esterilidad del polen. Diversos estudios en las especies del género han mostrado que éstas presentan altos porcentajes de polen no viable; Piven y col. (2001) reportaron un 66 % de polen no viable en *A. fourcroydes* y 51 % en *A. angustifolia*; Ruvalcaba-Ruiz y Rodríguez-Garay (2002) reportaron un 42 % de polen no viable en *A. tequilana* var. 'Azul' mientras que Escobar-Guzmán y col. (2008) observaron un 64 % y 20 % de polen no viable en *A. tequilana* var. 'Azul' y *A. americana*, respectivamente. De acuerdo a lo anterior, se puede observar un comportamiento similar con respecto a la baja viabilidad del polen en *A. tequilana* var. 'Azul' en comparación con otras especies del género, donde además de las anomalías aquí reportadas, pudieran estar involucradas otras como errores post-meióticos o fallas del tapetum, el cual juega un papel importante en la microsporogénesis y en la maduración del polen (Piven y col., 2001).

La ocurrencia de polen $2n$ en una población se puede identificar por la presencia de polen más grande de 1.2-1.3 veces el tamaño del polen normal, la presencia de diadas y triadas en la etapa de tétradas y un nivel de ploidía inesperado en la progenie de cruces tetraploides-diploides (Veilleux, 1985). La presencia de polen gigante reportado en este trabajo, así como diadas y triadas, corroboró que el polen gigante mencionado, era polen $2n$. En las especies del género *Agave*, el polen reducido se diferenció del polen $2n$ durante el análisis morfológico del mismo, ya que un aumento en la cantidad de ADN en la célula, provoca que el volumen del polen aumente e influya en el diámetro del mismo (Bretagnolle y Thompson, 1995; DeWitte y col., 2011). La presencia de polen más grande, se ha utilizado como indicador de la

producción de polen $2n$ en una especie y/o individuo (Yan y col., 1997; Becerra Lopez-Lavalle y Orjeda, 2002; Barba-Gonzalez y col., 2004; DeWitte y col., 2009); sin embargo, el polen reducido y el polen $2n$ a veces carecen de diferencias de tamaño bien definidas en pastos y otras especies polinizadas por el viento, haciendo más difícil la identificación de los mismos (Ramsey, 2007). En el presente trabajo se reportan las frecuencias promedio de polen $2n$ en las dos especies de *Agave*, que van del 1.2-3.2 %, sin embargo, cabe mencionar que también se observó que las frecuencias en la producción de polen $2n$ en plantas individuales fue variable, incluso en algunas plantas no se observó este tipo de polen, lo cual resulta típico de las especies agrícolas (Bretagnolle y Thompson, 1995), es decir, se observan individuos con porcentajes altos en comparación con otros, que poseen porcentajes más bajos de polen $2n$. Este hecho se ha reportado en una gran cantidad de trabajos en diversos géneros y especies como *Lolium perenne* (Sala y col., 1989), *Ipomoea trifida* (Orjeda y col., 1990), *Ipomoea batatas* (Becerra Lopez-Lavalle y Orjeda, 2002), *Pfaffia glomerata*, *P. tuberosa* (Taschetto y Pagliarini, 2003), *Populus tomentosa* Carr (Zhang y Kang, 2010), y también se ha reportado una variación en los porcentajes de polen $2n$ entre individuos de un mismo grupo taxonómico (Veilleux, 1985) e incluso de una flor a otra en un individuo o de una antera a otra en el mismo botón floral (Bretagnolle y Thompson, 1995).

La identificación de los mecanismos que dan lugar a la formación de gametos $2n$ es un tema complejo, ya que diferentes individuos de una misma especie pueden producir este tipo de gametos a través de diferentes mecanismos, y se puede presentar más de un mecanismo en una misma planta (Parrot y Smith, 1984; Werner y Peloquin, 1991; Becerra Lopez-Lavalle y Orjeda, 2002; Xu y col., 2008; Zhang y Kang, 2010; Wang y col., 2010). Se ha encontrado que existe una gran variedad de mecanismos citológicos involucrados en la producción de gametos $2n$. Bretagnolle y Thompson (1995) mencionan que los mecanismos más frecuentes son: fallas del huso mitótico en metafase I o II, una geometría anormal del huso mitótico en la segunda división y una citocinesis anormal. La presencia de un huso mitótico anormal en uno de los complementos cromosómicos después de la reducción cromosómica en *A. angustifolia* var. 'Lineño' y la falla en la citocinesis II en *A. tequilana* var. 'Azul' y *A. angustifolia* var. 'Lineño' sugiere la presencia de un mecanismo de restitución de la segunda división meiótica (SDR), ya que la primera división meiótica ocurre de manera normal, y es en la segunda

división en donde se presentan dichas anormalidades. De acuerdo a Mendiburu y Peloquin (1977), los gametos $2n$ formados por FDR transmitirían en teoría el 80% de la heterocigocidad de los padres a la progenie, mientras que los formados por SDR transmitirían solamente el 40%; esto se debe a que en un mecanismo SDR el gameto posee las dos cromátides hermanas, por lo que la progenie tendrá una menor heterocigocidad y epistasia que los padres (Bretagnolle y Thompson, 1995). Harlan y deWet (1975) mencionan que la poliploidización sexual es el principal mecanismo en el origen y evolución de los poliploides, por lo que estos hallazgos podrían ayudar a corroborar si la evolución del género *Agave* ocurrió por medio de gametos $2n$. No obstante de que en la actualidad se conocen muchas especies poliploides, los reportes acerca de la presencia de polen $2n$ son escasos; en el orden Asparagales existen muy pocos reportes acerca de la presencia de polen $2n$, algunos ejemplos son *Asparagus* y *Narcissus* (Camadro, 1994; Wu y col., 2011); por lo que este trabajo ayuda en la identificación y conocimiento de la presencia de polen $2n$ en la familia Agavaceae, ya que además de reportar la presencia de este tipo de polen, se mencionan sus frecuencias así como el mecanismo a través del cual se produce este tipo de polen tanto en *A. tequilana* var. 'Azul' como en *A. angustifolia* var. 'Lineño'.

En nuestros días, las especies comerciales más importantes del género *Agave* se propagan por medio de hijuelos y clones obtenidos a través del cultivo de tejidos, lo que da como resultado una menor variabilidad en comparación con la propagación por medio de semillas. Los investigadores se han enfocado en identificar tal variabilidad de acuerdo al mecanismo de propagación empleado en el cultivo para desarrollar programas de rehabilitación y conservación de los recursos genéticos en el género. Sin embargo, una alternativa importante a estos programas es el uso de polen $2n$, cuya presencia se ha reportado en este trabajo y en muchos otros géneros, y su utilidad en programas de mejoramiento se ha probado en diferentes cultivos como papa (Mok y Peloquin, 1975a), rosa (Crespel y col., 2006), lili (Barba-Gonzalez y col., 2004; Lim y col., 2004) y alfalfa (Tavoletti y col., 1991a) entre otros.

La importancia de este trabajo al identificar la presencia de polen $2n$ y el mecanismo de restitución involucrado en la formación de este tipo de gametos en las especies de *Agave*, radica en que provee un conocimiento básico para el desarrollo de programas de mejoramiento

genético en el género así como los efectos teóricos de los mecanismos involucrados en la formación de este tipo de gametos en el género.

VII.2 Mapeo físico del 5S y 45S de ADNr de trigo y *Agave*

VII.2.1 Clonación de las secuencias de ADNr de *A. tequilana* var. 'Azul'

VII.2.1.1 Aislamiento del ADN genómico de *A. tequilana* var. 'Azul'

Una vez que se extrajo el ADN genómico de *A. tequilana* var. 'Azul' de acuerdo al método de CTAB, la calidad del mismo se determinó en un gel de agarosa al 1 %, en donde presentó una banda intensa y definida, como se puede observar en la Figura 11, carriles 2-5, por lo que se utilizaron en la amplificación de las secuencias de los ADNr. Las muestras se diluyeron a una concentración de 10 ng/ μ l y se conservaron a -20 °C hasta su uso en las reacciones de amplificación. Para la obtención de secuencias específicas de *A. tequilana* var. 'Azul' se probaron los iniciadores mencionados previamente en la Metodología para las secuencias 5S, 5.8S, 18S y 26S de ADNr.

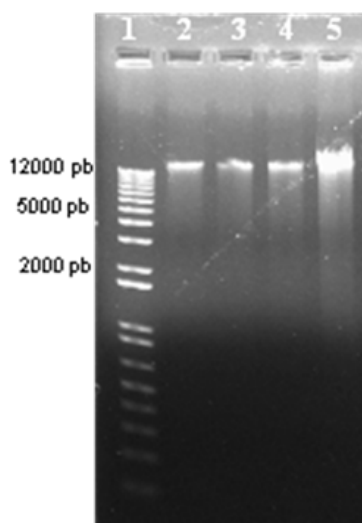


Figura 11. Gel de calidad del ADNg extraído de *A. tequilana* var. 'Azul'. En los carriles 2-5 se observan las muestras de ADNg de *A. tequilana* var. 'Azul' y el marcador de peso molecular de 1 Kb plus en el carril 1.

VII.2.1.2 Amplificación de la secuencia del 5S de ADNr de *A. tequilana* var. 'Azul'

Al emplear los distintos iniciadores en la amplificación del 5S de ADNr de *A. tequilana* var. 'Azul', se pudo determinar que en la combinación de iniciadores F1: 5'-CAC CAG ATC CCA TCA GAA CT-3' y R3: 5'-TTA GTC TGG TAT GAT CGC AC-3', se obtuvo principalmente un fragmento de ≈ 400 pb a través de la electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio (Figura 12).

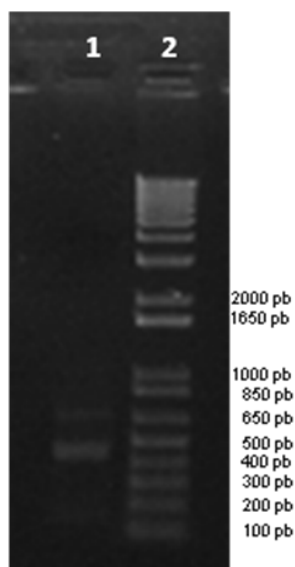


Figura 12. Gel de agarosa al 1 % del 5S de ADNr de *A. tequilana* var. 'Azul'. En el carril 1 se observa el fragmento amplificado del 5S de ≈ 400 pb y el marcador de peso molecular de 1 Kb plus en el carril 2.

VII.2.1.3 Amplificación de la secuencia del 18S de ADNr de *A. tequilana* var. 'Azul'

En el caso del 18S de ADNr, se obtuvo un fragmento de ≈ 1400 pb como producto de la amplificación, que se comprobó también por electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio; la amplificación de este fragmento se obtuvo con los iniciadores F1: 5'-CAA AGA TTA AGC CAT GCA TG-3' y R1: 5'-CCC AGA ACA TCT AAG GGC AT-3' (Figura 13).

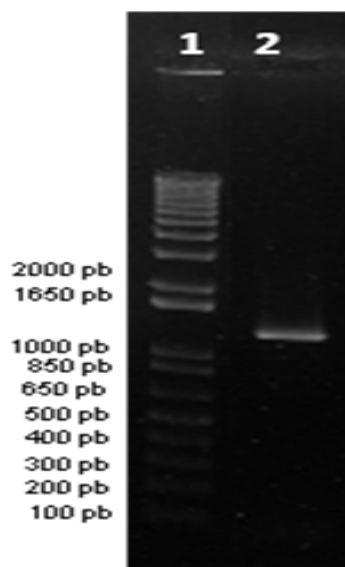


Figura 13. Gel de agarosa al 1 % del 18S de ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 1 Kb plus y en el carril 2, el fragmento amplificado del 18S de \approx 1400 pb.

VII.2.1.4 Amplificación de las secuencias del 5.8S y 26S de ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’

En el caso de la secuencia del 5.8S de ADNr no fue posible obtener un fragmento único con los diferentes iniciadores y condiciones de reacción. En este ADNr, se amplificaban varios fragmentos de tamaños variables como \approx 250, 550, 750, 1500 y 2000 pb, por lo que no se tuvo la seguridad de haber amplificado dicho fragmento y se decidió no trabajar con el mismo (Figura 14); en el caso del 26S, no mostró ningún fragmento de amplificación, lo cual se debió probablemente a que los iniciadores empleados no fueron complementarios a ninguna región del ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’.

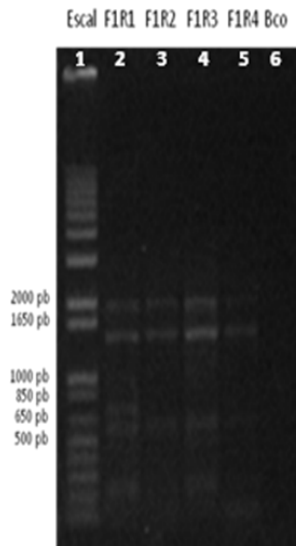


Figura 14. Gel de agarosa al 1 % del 5.8S de ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 1 Kb plus y en los carriles 2-5, los fragmentos amplificados del 5.8S de ADNr.

VII.2.1.5 Transformación de *E. coli* DH5a con ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’

La transformación de *E. coli* DH5a dio como resultado 10 colonias transformadas con la secuencia parcial del 5S de ADNr y 5 colonias con la secuencia parcial del 18S de ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’; la comprobación de las transformaciones se realizó mediante la amplificación de cada secuencia con los iniciadores específicos y con los iniciadores universales T7/SP6; el resultado se visualizó en gel de agarosa al 1 % (Figuras 15 y 16), empleando bromuro de etidio como reactivo de revelado y un marcador de peso molecular de 1 Kb plus. La electroforesis del 5S de ADNr (Figura 15) mostró la presencia de varios fragmentos de tamaños variables, por lo que se seleccionaron cuatro colonias, indicadas en círculos rojos (colonias 3, 4, 7 y 9), para su secuenciación en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV, Irapuato; en el caso del 18S de ADNr (Figura 16), la electroforesis mostró la presencia de un solo fragmento de \approx 1400 pb, señalado en un círculo rojo, por lo que se seleccionó la colonia 15 para su secuenciación.

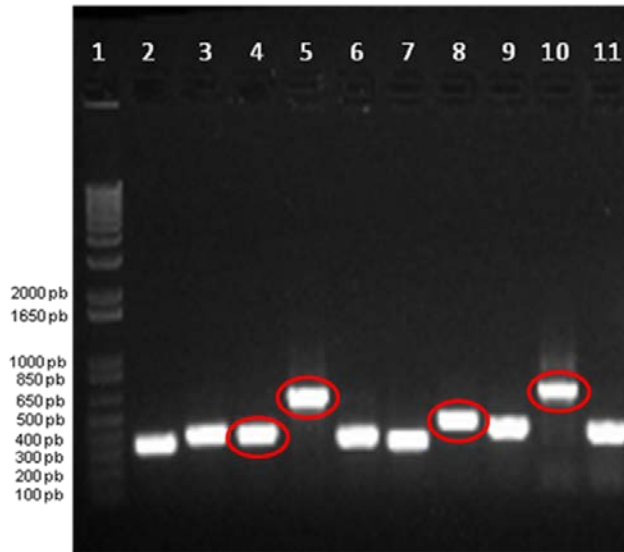


Figura 15. Análisis de las colonias de *E. coli* transformadas con la secuencia 5S de ADNr de *A. tequilana* var. 'Azul'. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 1 Kb plus y en los carriles 2-11 las colonias (1 al 10) con fragmentos de diferentes tamaños de ADNr.

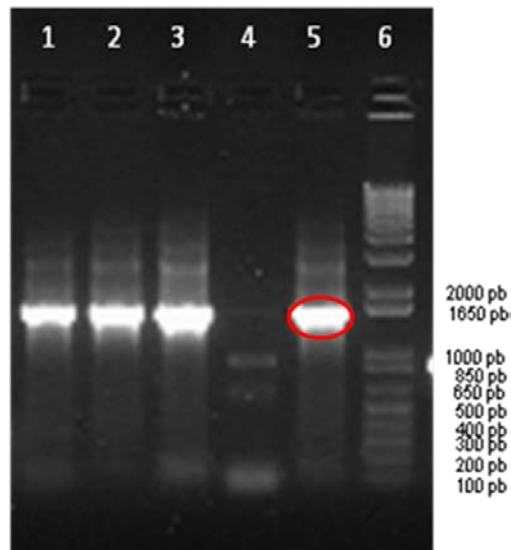


Figura 16. Análisis de las colonias de *E. coli* transformadas con la secuencia 18S de ADNr de *A. tequilana* var. 'Azul'. En los carriles 1-5 se observan las colonias (11-15) con el fragmento de la secuencia 18S de ADNr, excepto el carril 4 y en el carril 6 el marcador de peso molecular de 1 Kb plus.

VII.2.1.6 Obtención de las secuencias parciales de los ADNr por secuenciación.

En el Cuadro 6 se presenta la codificación de las colonias transformadas de *E. coli* DH5 α con los fragmentos amplificados del 5S y 18S de ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’ enviadas para la secuenciación de dichas colonias.

Cuadro 6. Codificación de las colonias de *E. coli* transformadas con los fragmentos de ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’ para su secuenciación.

5S ADNr	Codificación
Col 3	Sec 1
Col 4	Sec 2
Col 7	Sec 3
Col 9	Sec 4
18S ADNr	Codificación
Col 15	Sec 18S

La secuenciación de los fragmentos amplificados de los ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’ se realizó en el LANGEBIO, y a partir del análisis de los electroferogramas, se editaron las secuencias parciales con el programa Bioedit 7.0.9 y se identificaron diversos tamaños de los fragmentos amplificados del 5S, mientras que en el caso del 18S, debido a su gran tamaño, después de la edición, se unieron los fragmentos obtenidos del forward y reverse a través del empalme de cada uno de ellos. En los Cuadros 7 y 8, se muestran el tamaño y las secuencias de cada fragmento parcial amplificado del 5S y 18S de ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’.

Cuadro 7. Secuencias parciales del 5S de ADNr de *A. tequilana* var. 'Azul'.

5S ADNr			
Colonia	Código	Tamaño del fragmento	Secuencia
Col 3	Sec 1	191 pb	CACCAGATCCCATCAGAACTCCACAGTTAAGCGAGCTTGGGCGA GAGTAGTACTAGGATGGGAAGTCCTCGTGTTGCACCCTTACGCT AGGATGGCCATAGCGTGCCTTGCAAGATACCTTCTTTGTTAGTC CCAGCGTTTTAGTAGGAAGGCAAAGCAATCTTGGATCGGTGCGA TCATACCAGACTAA
Col 4	Sec 2	436 pb	CACCAGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGA GAGTAGTACTAGGAACGGTGACTCTCCCCATTATAAACGTGACG ATTTTTTAATTGACATCTTTCGCAGTTAATATCCATATGGGTGG GTGCACTAGGACCTCCTGGGAAATTAGGGTGCTAAGCGGTTAAG ATACTCTCGGCGATATCGCAGTTAACCTGGATTCCCTAGTATGG GAAGTCCTAGTTATTTTCGTGGAAAAATAAATAGTCCAACACTA GTGCATCGGATCCCACAGGGTGCTTAAGTGTGGAGTTCTCACTA ATCGTTTTCGCTCCTGGCACGGAGTTAACGAAAGGGAGTTAGATC ATTTAATTTTGCAGAGGTATGATTTTACTTTTTTATGAAAAGGGA AATATTGGAACCTTGCGGGTGCGATCATAACCAGACTAA
Col 7	Sec3	245 pb	CACCAGATCCCATCAGAACTCCGCAAAGGTTCCGCAATAATTCT GAATAATTTAAACTTGCTCAAGGGTTAAGTATAAAGAAATCACT ATGTTACTAGCGAGGGTGCAACGTGGATATATTAAGTTATCTCA CCGATATATGCTATGGAACCTTAGTCGGGCCCCGCGAGATACCTT CTTTGTTAGTCCCAGCGTTTAAGTAGGAAGGCAAAGTAATCTTG GATGGGTGCGATCATAACCAGACTAA
Col 9	Sec4	474 pb	CACCAGATCCCATCAGAACTCTGTAGTTAAGCGTGCTTGGGCGA GAGTAGTACTAGGATGGGTGACCTCCTGGGTAGTCCTCGTGTTG CACCTCACTTTTTTTCATTTATTTTTTGATTTTCACGTTTCGCTAT TCCACGCTGTTTCGAACATAGTGATTTAACTTTTTTATTTTGTAT TTTTATCAATATTTTCGTTACGTATATTTATTATTATTTTTTAATT AATTATTTAATTAATAGTTTCGCTCTATCTTTCCCTGTTTATTCT TTGTTTGTATTTTCAATTTTGTTTTTTTTTTTCTTTTCTTATTTTCTAT AATTTCTATTTTTTTAATTGACATCTCGGGATACTAGCTAGGAAG GCCACGCCGACGGCCCTAGCGGGCTCCGCGAGATACCTTCTTT GTTAGTGCCAGCGTTTAAGTAGGAAGGCAAAGCAATCTTCGATG GGTGCATCATAACCAGACTAA

Cuadro 8. Secuencia parcial del 18S de ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’.

18S ADNr			
Colonia	Código	Tamaño del fragmento	Secuencia
Col 15	Sec 18S	1424	CAAAGATTAAGCCATGCATGTGTAAGTATGAACAAATTCAGA CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAATCAGTTATAGTTTGT TGATGGTACTTGCTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCT AATACGTGCAACAAAACCCGACTTCTGGAAGGGATGCATTTA TTAGATAAAAAGGCTGACGCGGGCTTTGCCGCTGCTCTGATG ATTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGCCCTCGTGCCGGCG ACGCATCATCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGG ATAGAGGCCTACCATGGTGGTGACGGGTGACGGAGAATTAGG GTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC CAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACG GGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCTCGTACGAG TCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGG ATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATT CCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGC TCGTAGTTGGACTTTGGGCTGGGCCGGCCGGTCCGCCTCTGGT GTGCACCTGCCGTCCCGTCCCTTCTGCCGGCGATGCGCTCCTG GCCTTAAGTGGCCGGGTCGTGCCTCCGGCCGCCGTTACTTTGAA GAAATTAGAGTGCTCAAAGCAAGCCCACGCTCTGTATACATT AGCATGGGATAACATCACAGGATTTCCGGTCTATTATGTTGGC CTTCCGGGATCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCA TTCGTATTTTCATAGTCAGAGGTGAAATTCTTGATTATGAAA GACGAACAACGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTA ATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATCAGATACC GTCCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACCAGGGATCGGCG GATGTTGCTTTTAGGACTCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAA AGTTTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAAC TTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCT GCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTTACCAGGTCCA GACATAGTAAGGATTGACAGACTGAGAGCTCTTTCTTGATTCT ATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTT GTCTGGTTAATCCGTTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAC TAGCTACGCGGAGGCATCCCTCCGCGCCAGCTTCTTAGAGG GACTATGGCCTTTTAGGCCACGGAAGTTTGAGGCAATAACAG GTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGG.

VII.2.2 Análisis de las secuencias parciales de ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’

Una vez que se tuvieron las secuencias parciales de cada ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’, se realizó un análisis blastn (nucleotide blast) en la base de datos de NCBI, lo cual indicó que los fragmentos amplificados si correspondían a secuencias del 5S y 18S de ADNr. La

amplificación del 5S de ADNr de *A. tequilana* var. 'Azul' generó una banda de ≈ 400 pb, la cual una vez clonada, permitió el aislamiento de cuatro clones; después de ser secuenciados dichos clones mostraron fragmentos de 191 pb, 436 pb, 245 pb y 474 pb. Al realizar el blastn en la base de datos del NCBI, se pudo observar que la secuencia 1 del fragmento amplificado del 5S del ADNr presentó una máxima identidad del 95 % con *Aegilops crassa* clon CR777-9 (GenBank: HQ270732.1); la secuencia 2 (GenBank: KF159808) presentó una máxima identidad del 97 % con *Arabidopsis thaliana* clon CIC YAC 9A12 y 9A5 (GenBank: AF198223.1); la secuencia 3 presentó una máxima identidad de 100 % con *Blechnum spicant* espécimen voucher DR:00779932 (GenBank: FR694367.1) y del 96 % con *A. tequilana* var. 'Azul' (GenBank: GQ983554.1); la secuencia 4 presentó una máxima identidad del 91 % con *Valeriana flaccidissima* clon F1 (GenBank: EU926608.1).

La amplificación del 18S de ADNr de *A. tequilana* var. 'Azul' generó una banda de ≈ 1400 pb, la cual una vez clonada, permitió el aislamiento de un solo clon; después de la secuenciación, se determinó que poseía un fragmento de 1424 pb (GenBank: KF159807). Al realizar el blastn en la base de datos del NCBI, se observó que dicho fragmento presentó una máxima identidad del 100 % con *A. tequilana* cv. 'Azul' (GenBank: GU980213.1) y con *A. ghiesbreghtii* voucher Chase 3467(K) (GenBank: HM640709.1).

VII.2.3 Hibridación *in situ* fluorescente con sondas de ADNr

VII.2.3.1 Hibridación *in situ* fluorescente con sondas de ADNr de trigo

El mapeo físico del 5S y 45S de ADNr de trigo se llevo a cabo por medio de una FISH simultánea con las sondas pTa71 (marcada con biotina y detectada como una señal roja) y pTa794 (marcada con digoxigenina y detectada como una señal verde). La FISH mostró que el número y localización de los *loci* de ADNr fue constante en cada una de las especies en estudio. La sonda pTa71 mostró que los *loci* del 45S de ADNr se localizan en dos sitios en cada especie, es decir, en un par de cromosomas homólogos en cada una de ellas (Figura 17a-d). También se observó que estos *loci* están asociados a la constricción secundaria de un par de cromosomas grandes en cada una de las especies y los cuales correspondían a un par de

cromosomas telocéntricos en los casos de *A. cupreata*, *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ y ‘Cimarrón’ mientras que en *A. tequilana* var. ‘Azul’ fue un par de cromosomas subtelocéntricos. Así mismo, la sonda pTa794 mostró que los *loci* del 5S de ADNr se localizan en ambos brazos de un par de cromosomas pequeños en cada una de las especies (Figura 17a-d).

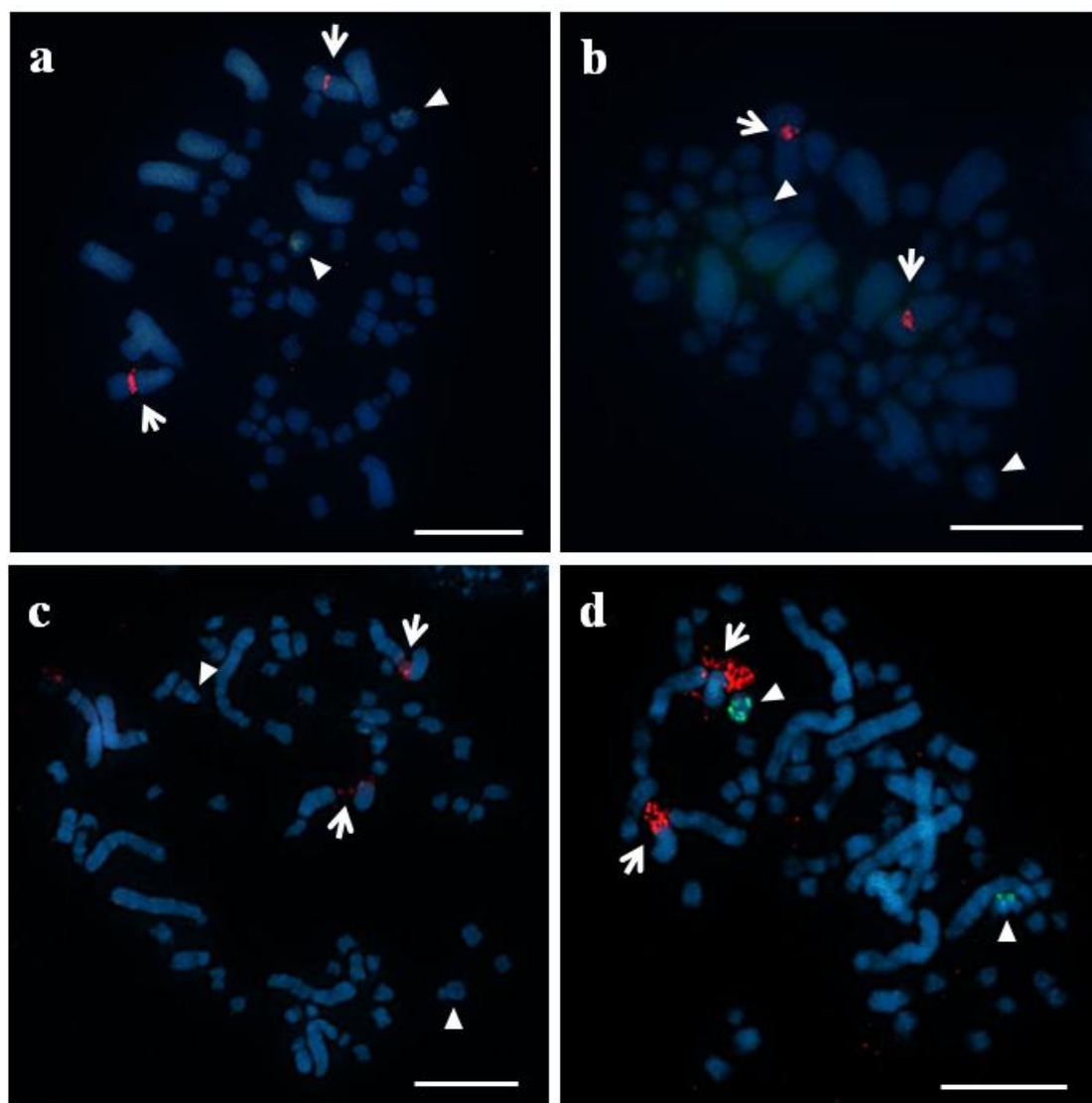


Figura 17. FISH del 5S (verde, punta de flechas) y 45S (rojo, flechas) de ADNr de trigo en las especies del género *Agave*. **a** *A. tequilana* var. ‘Azul’; **b** *A. cupreata*; **c** *A. angustifolia* var. ‘Lineño’. **d** *A. angustifolia* var. ‘Cimarrón’. Barras = 10 μm.

VII.2.3.2 Hibridación *in situ* fluorescente con sondas de ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’

Posteriormente, una vez clonadas las secuencias del 5S y 18S de ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’, se llevo a cabo la hibridación *in situ* con estas sondas, las cuales se marcaron con biotina y se detectaron como señales rojas; la FISH se realizó con dos clones de la secuencia del 5S (cada uno por separado) y el clon del 18S en cada una de las especies en estudio. La hibridación simultánea con ambas sondas mostró un comportamiento similar al observado en la hibridación de los ADNr de trigo; es decir, se identificaron dos sitios de hibridación del 18S, los cuales se encontraron asociados a la constricción secundaria de un par de cromosomas grandes (Figura 18a-d); en el caso de los *loci* del 5S, estos se localizaron en ambos brazos de un par de cromosomas pequeños en cada una de las especies (Figura 18a-d).

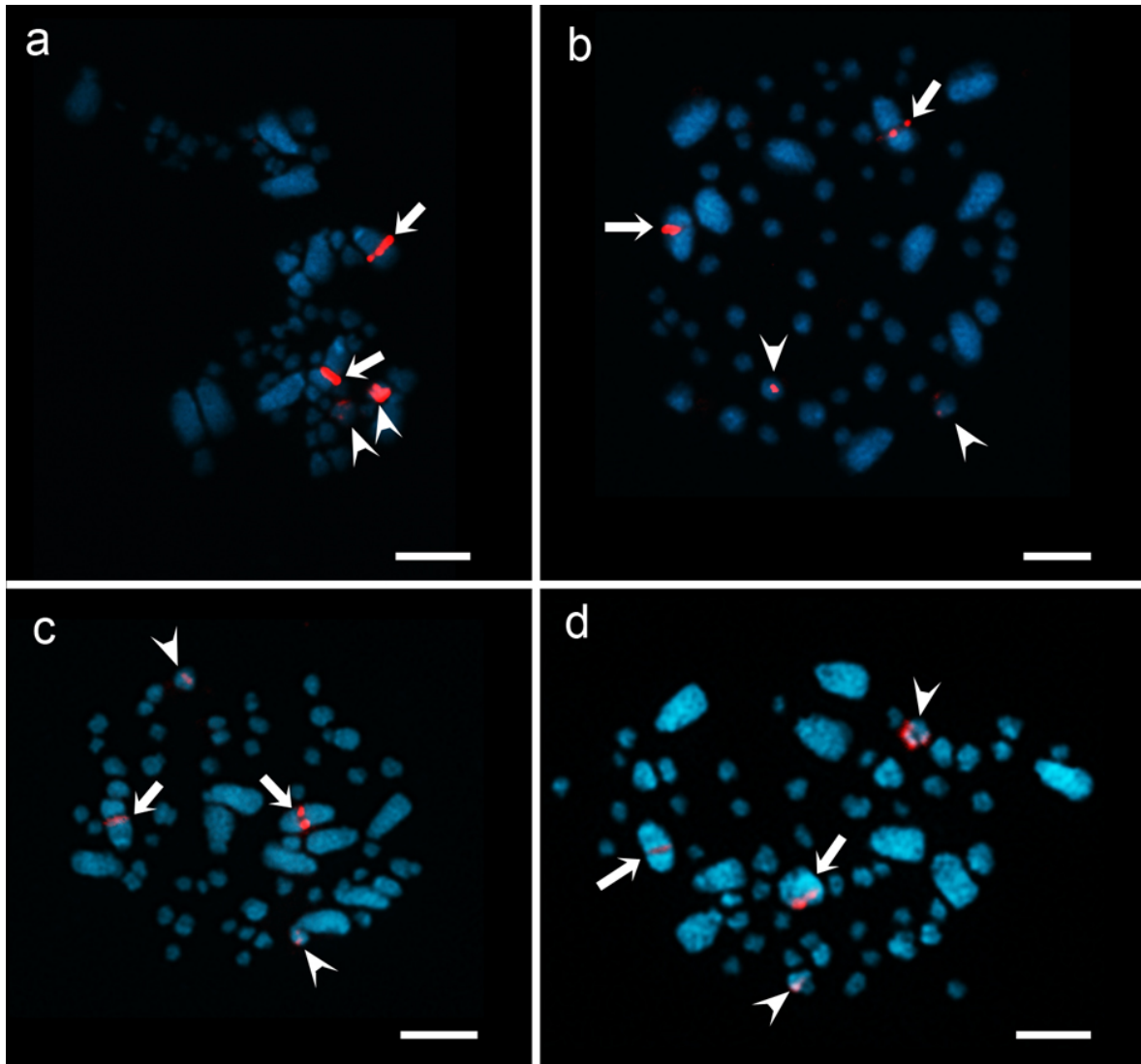


Figura 18. FISH del 5S (punta de flechas) y 18S (flechas) de ADNr de *A. tequilana* var. 'Azul' en las especies del género *Agave*. **a** *A. tequilana* var. 'Azul'; **b** *A. cupreata*; **c** *A. angustifolia* var. 'Lineño'; **d** *A. angustifolia* var. 'Cimarrón'. Barras = 10 μ m.

VII.2.3.3 Hibridación *in situ* fluorescente con sondas de ADNr de trigo y *Agave*

Para llevar a cabo la hibridación de manera simultánea, las sondas del 5S y 45S de ADNr de trigo se marcaron con fluoresceína y se detectaron como señales verdes, mientras que el 18S y las secuencias 1 y 2 del 5S de ADNr de *A. tequilana* var. 'Azul' se marcaron con biotina y se

detectaron como señales rojas. La FISH mostró un traslape de ambas sondas debido a la similitud existente entre ellas (y en donde las señales se identificaron con la combinación de los colores de ambas sondas, Figura 19a-d), por lo que el número y localización de los *loci* de ambos ADNr fue idéntico, es decir, se observaron los dos sitios de hibridación del 18S, asociados a la constricción secundaria de un par de cromosomas grandes (Figura 19a-d) mientras que los *loci* del 5S se localizaron en ambos brazos de un par de cromosomas pequeños (Figura 19a-d).

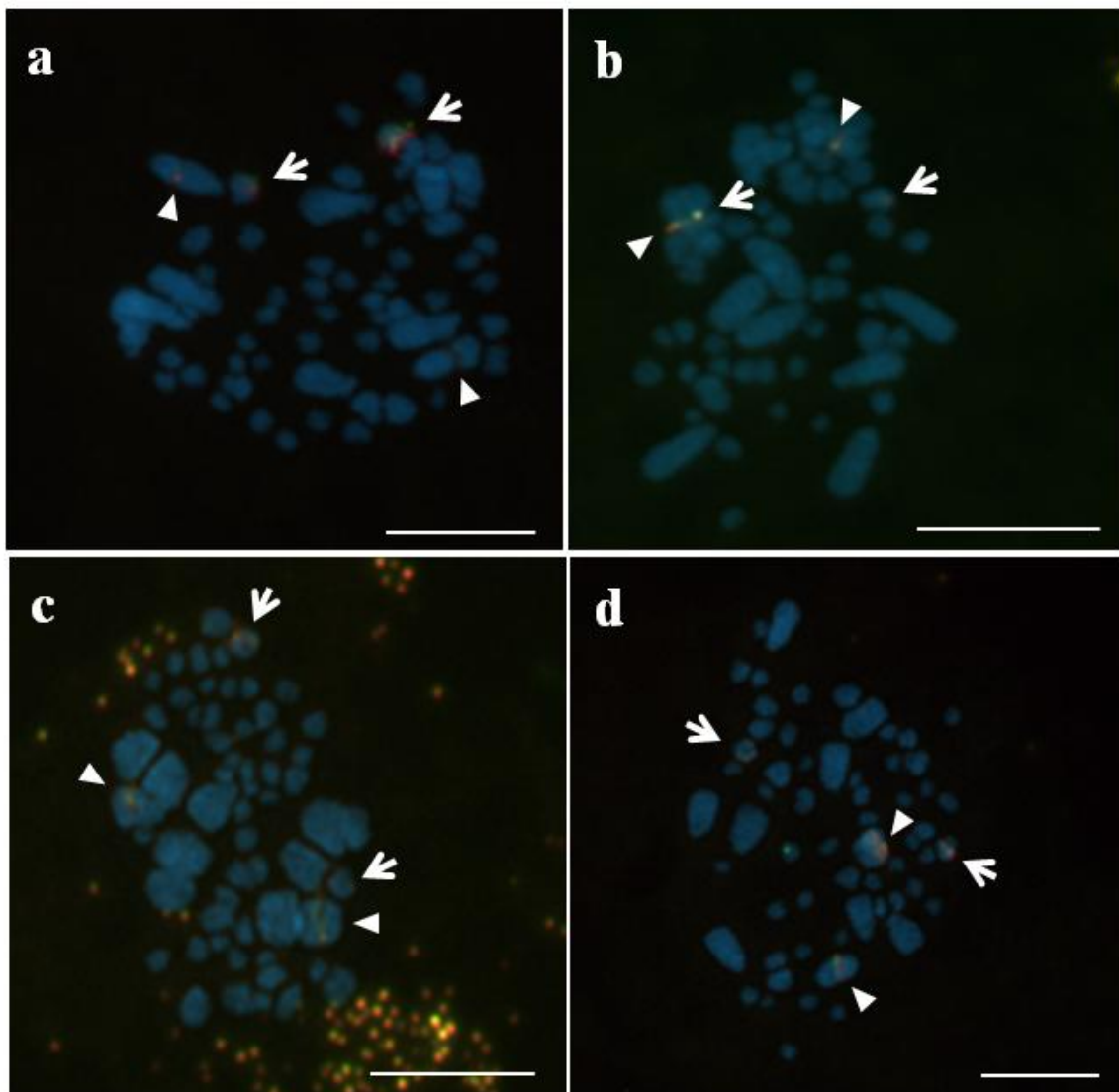


Figura 19. FISH del 5S (flechas) y 18S-45S (punta de flechas) de ADNr de trigo y *A. tequilana* var. ‘Azul’ en las especies del género *Agave*. **a** *A. tequilana* var. ‘Azul’; **b** *A. cupreata*; **c** *A. angustifolia* var. ‘Lineño’; **d** *A. angustifolia* var. ‘Cimarrón’. Barras = 10 μ m.

La hibridación *in situ* fluorescente con las sondas de ADNr mostró que los *loci* del 18S y 5S de ADNr en las especies de *Agave* se localizan en diferentes cromosomas y en una posición similar en todas las especies; esto sugiere que los cromosomas que poseen los *loci* de ADNr son homeólogos y que las diferencias en la asignación numérica en los cariotipos, se debe a intercambios cromosómicos heterocigóticos (Moreno-Salazar y col., 2007; Palomino y col., 2008; Palomino y col., 2010). El *locus* del 18S de ADNr siempre se localizó en la región intersticial del brazo grande de un cromosoma grande y asociado a la constricción secundaria, mientras que los *loci* del 5S de ADNr se localizaron en una región proximal en ambos brazos de un cromosoma pequeño en todas las especies. Estos resultados difieren de los reportados por Robert y col. (2008) debido a que ellos mencionan que las especies de *Agave* poseen un *locus* del 5S de ADNr por genoma monoploide en algunas especies diploides y poliploides en el género, en las que incluyen a *A. tequilana* var. ‘Azul’, *A. angustifolia* ‘Letona’ (tetraploide) y a *A. angustifolia* ‘Chelem ki’ (hexaploide). La presencia de los *loci* del 5S de ADNr en ambos brazos de un cromosoma pequeño en todas las especies puede ser el resultado de una recombinación desigual o de un evento de transposición; esto último se ha reportado previamente en otras especies monocotiledóneas como *Allium* (Schubert y Wobus, 1985), *Oryza* (Shishido y col., 2000) y *Alstroemeria* (Chacón y col., 2012). Recientemente, Khaliq y col. (2012), reportaron que los retrotransposones Ty1-Copia son uno de los principales componentes del genoma de *Agave tequilana* (aproximadamente 32 %) y que han desempeñado un papel clave en la organización y evolución del mismo, lo cual podría explicar los resultados aquí mencionados.

VII.2.3.4 Cariotipos de las especies de *Agave*

Los cariotipos de *A. tequilana* var. ‘Azul’, *A. cupreata*, *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ y ‘Cimarrón’ se realizaron con la ayuda de la Dra. Guadalupe Palomino, del Instituto de Biología de la UNAM. A partir del análisis de las imágenes obtenidas mediante FISH con las

sondas de ADNr de trigo y *Agave* en cada una las especies estudiadas, se determinó que todas las especies eran diploides con $2n = 2x = 60$, lo cual se confirmó por el conteo de cromosomas y considerando el número cromosómico básico del género $x = 30$. También se observó en todas las especies un cariotipo bimodal con cinco pares de cromosomas grandes y 25 pares de cromosomas pequeños. El análisis cariotípico de las especies de *Agave* se presenta en el Cuadro 9, y en donde se puede observar que todas las especies mostraron diferentes fórmulas cariotípicas así como también una constricción secundaria en un par de cromosomas grandes; dicha constricción secundaria se observó en el par 1 en *A. tequilana* var. ‘Azul’, en el par 3 en *A. cupreata*, en el par 5 en *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ y en el par 2 en *A. angustifolia* var. ‘Cimarrón’.

Cuadro 9. Análisis cariotípico de las especies de *Agave* ($2n = 2x = 60$).

Taxón y origen	Colector e información de las accesiones	Fórmula cariotípica	Constricción secundaria
<i>A. angustifolia</i> var. ‘Cimarrón’ Tolimán, Jalisco, México. 19° 32' 06" N; 103° 53' 44" W (DMS).	Rodríguez JM C	42m + 4sm + 6st + 8t †	2t
<i>A. angustifolia</i> var. ‘Lineño’ Tolimán, Jalisco, México. 19° 32' 06" N; 103° 53' 44" W (DMS).	Rodríguez JM L	48m + 2sm + 2st + 8t †	2t
<i>A. cupreata</i> Miraval, Guerrero, México. 17° 43' 00" N; 99° 45' 00" W (DMS).	Trinidad RA 573	42m + 2sm + 8st + 8t ‡	2t
<i>A. tequilana</i> var. ‘Azul’ CIATEJ, Jalisco, México. 20° 41' 39" N; 103° 20' 47" W (DMS).	Rodríguez JM A, C, D	42m + 12st + 6t §	2st

† = Datos sin publicar de Palomino y col.

‡ = Cariotipo publicado por Palomino y col. (2012).

§ = Cariotipo publicado por Palomino y col. (2008).

Los datos obtenidos de FISH se utilizaron para la elaboración de los idiogramas de cada especie, y en donde se indica el número y posición de los *loci* de ADNr. Los *loci* del 5S de ADNr siempre se localizaron en la región proximal en ambos brazos de un par de cromosomas pequeños en cada especie, mientras que los *loci* del 18S de ADNr se localizaron en la región intersticial de un par de cromosomas grandes. La Figura 20 muestra las señales de hibridación del 18S y 5S de los ADNr en las especies de *Agave*; en *A. tequilana* var. ‘Azul’ se observaron

en el par 1 y en ambos brazos del par 10, respectivamente; en *A. cupreata* en el par 3 y en ambos brazos del par 8, respectivamente; en *A. angustifolia* var. 'Lineño' en el par 5 y en ambos brazos del par 11, respectivamente; en *A. angustifolia* var. 'Cimarrón' en el par 2 y en ambos brazos del par 11, respectivamente.

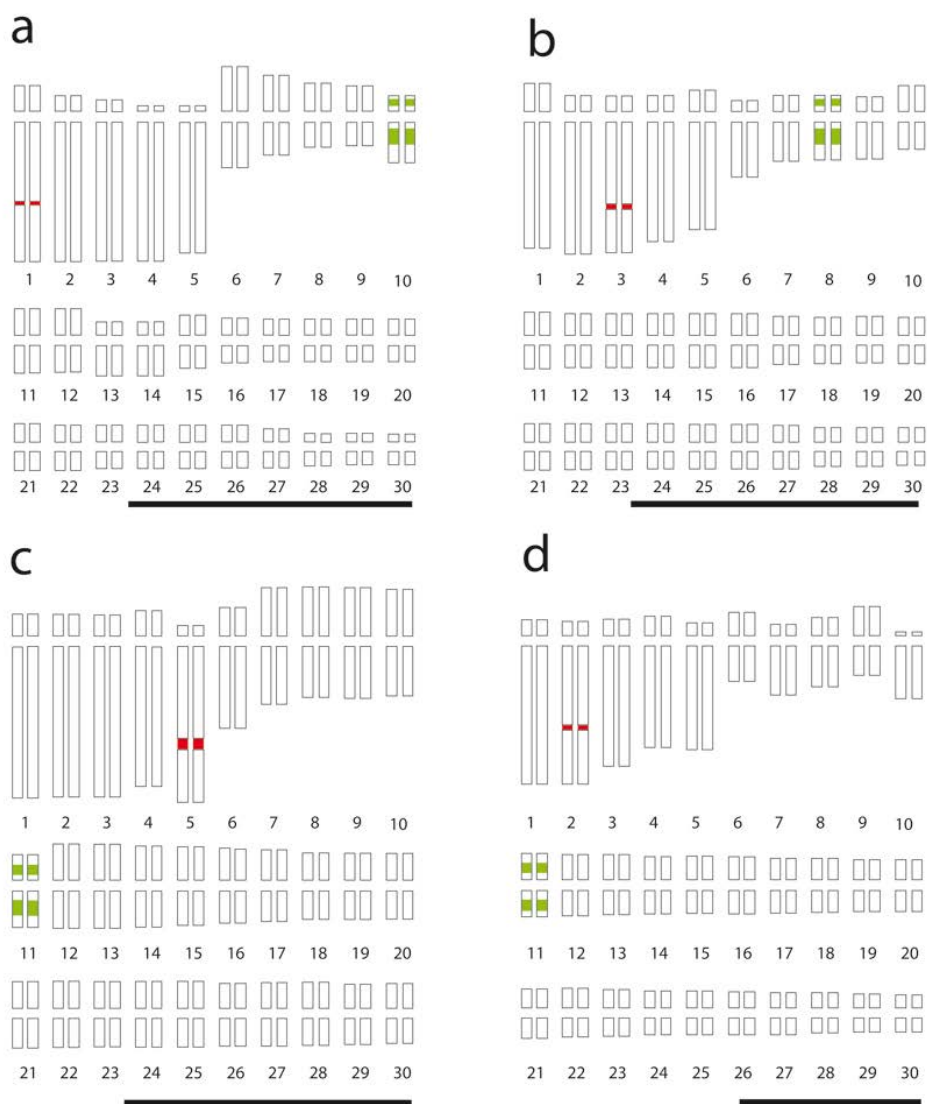


Figura 20. Idiogramas de los cariotipos de las especies de *Agave* indicando los sitios de hibridación del 5S (verde) y 18S (rojo) de ADNr. **a** *A. tequilana* var. 'Azul'; **b** *A. cupreata*; **c** *A. angustifolia* var. 'Lineño'; **d** *A. angustifolia* var. 'Cimarrón'. Barras = 10 μ m.

El análisis citogenético mostró el número cromosómico diploide $2n = 60$ en todas las especies, lo cual coincide con reportes previos en el género (Palomino y col., 2005; Palomino y col., 2008; Palomino y col., 2010). Todas las especies mostraron un cariotipo bimodal con cromosomas grandes (G) y pequeños (P) ($n = G + P$); este cariotipo bimodal se comparte entre varios géneros en Asphodeloideae (Brandham y Doherty, 1998; Adams y col., 2000; Vosa, 2005) y Agavoideae (McKelvey y Sax, 1933; Brandham, 1969a); recientemente, McKain y col. (2012) demostraron que el cariotipo bimodal de Agavoideae se originó debido a un evento de alopoliploidía, donde las especies progenitoras parecen estar extintas. No obstante de mantener el mismo cariotipo bimodal en todas las especies, también se encontraron diferentes fórmulas cariotípicas, que en el caso de *A. tequilana* var. 'Azul' fue $42m + 12st + 6t$; el de *A. cupreata* $42m + 2sm + 8st + 8t$; el de *A. angustifolia* var. 'Lineño' $48m + 2sm + 2st + 8t$; y el de *A. angustifolia* var. 'Cimarrón' $42m + 4sm + 6st + 8t$. Esta variación inter- e intraespecífica antes mencionada, se ha reportado también en otras especies y variedades dentro del género (Banerjee y Sharma, 1988; Moreno-Salazar y col., 2007; Palomino y col., 2008), lo que conlleva a la formación de diferentes citotipos. Moreno-Salazar y col. (2007) estudiaron tres poblaciones silvestres de *A. angustifolia* y encontraron dos citotipos diferentes; Palomino y col. (2008) analizaron ocho variedades de *A. tequilana* y reportaron el mismo número de citotipos. La presencia de diferentes citotipos en el género *Agave* pudieron originarse debido a intercambios cromosómicos heterocigóticos (Moreno-Salazar y col., 2007; Palomino y col., 2008; Palomino y col., 2010), los cuales pueden modificar la estructura de los cromosomas y mantener al mismo tiempo su número diploide (Lima-Cardoso y col., 2013).

En este trabajo se reporta por primera vez el número y localización de los *loci* de ADNr en dos especies, *A. cupreata* y *A. angustifolia* var. 'Lineño' y 'Cimarrón' así como un *locus* diferente del 5S de ADNr en todas las especies estudiadas. Los datos obtenidos de FISH proveen nueva información acerca del mapeo físico de los ADNr en las especies del género *Agave*, por lo que dichos sitios de hibridación pueden ser empleados como marcadores moleculares para la identificación de cromosomas en híbridos obtenidos en programas de mejoramiento así como en estudios evolutivos.

No obstante de la gran diversidad del género *Agave*, el cual incluye a 166 especies, el mapeo físico de los ADNr u otros marcadores moleculares es escaso, ya que solamente cinco especies han sido descritas. Las diferentes fórmulas cariotípicas encontradas en todas las especies indican la presencia de citotipos, mientras que los datos de FISH de los ADNr permitieron el mapeo físico de *A. cupreata* y dos nuevas variedades de *A. angustifolia*. Este trabajo provee nueva información acerca de la posición y número de los *loci* de ADNr en las especies del género *Agave* a través del análisis cariotípico comparativo, sin embargo, se debe realizar una investigación citogenética más amplia para entender la evolución del género y desarrollar programas de mejoramiento genético para preservar su biodiversidad. Es decir, la identificación de los sitios de hibridación de los ADNr así como los cariotipos aquí reportados pueden utilizarse en la identificación de las especies estudiadas, en el análisis de cómo el número de los *loci* de los ADNr en el género han ido evolucionando, y como ayuda en los programas de mejoramiento genético al identificar el origen de los cromosomas en los híbridos obtenidos.

La presencia de polen $2n$ en las especies estudiadas proveen la oportunidad de aprovechar este recurso en el desarrollo de programas de mejoramiento genético, ya que se pueden utilizar este tipo de gametos en la incorporación de genes de importancia agronómica de poblaciones silvestres en las especies cultivadas, lo que generaría un aumento en la variabilidad y heterocigocidad de estas últimas. También pueden ayudar en la recuperación de la diversidad de dichas especies, ya que al aumentar la ploidía de la planta, aumenta también la heterocigocidad debido a la presencia de tres o más alelos por *locus*.

VIII. CONCLUSIONES

El análisis citológico de la microsporogénesis en *Agave tequilana* var. 'Azul' y *A. angustifolia* var. 'Lineño' y 'Cimarrón' permitió la identificación de diversas anormalidades como: puentes cromosómicos, cromosomas retrasados, micronúcleos, mónadas, diadas y triadas, mientras que el análisis morfológico del polen confirmó la presencia de polen $2n$. El origen de este tipo de gametos fue debido a dos diferentes mecanismos de restitución meiótica en *A. tequilana* var. 'Azul' y *A. angustifolia* var. 'Lineño': una falla en la citocinesis II así como un huso mitótico anormal. Los mecanismos de restitución involucrados en la formación de los gametos $2n$ son equivalentes a la Restitución de la Segunda División Meiótica.

El análisis citogénético en *A. tequilana* var. 'Azul', *A. cupreata* y *A. angustifolia* var. 'Lineño' y 'Cimarrón' mostró que todas las especies poseían un número cromosómico diploide $2n = 60$, con un cariotipo bimodal compuesto de cinco pares de cromosomas grandes y 25 pares de cromosomas pequeños. También se observaron diferentes fórmulas cariotípicas con una constricción secundaria en un par de cromosomas grandes en todas las especies. El mapeo físico del 5S y 45S de ADN ribosomal (ADNr) en las especies mencionadas mostró que el 5S de ADNr se localizó en ambos brazos de un par de cromosomas pequeños, mientras que el 45S de ADNr estaba asociado a la constricción secundaria de un par de cromosomas grandes, logrando identificar dos pares de cromosomas en cada una de las especies estudiadas.

Se observó que las especies *A. tequilana* var. 'Azul' y *A. angustifolia* var. 'Lineño' y 'Cimarrón' poseen una inflorescencia abierta con una maduración acropétala así como una asincronía en la microsporogénesis.

La microsporogénesis observada en *A. tequilana* var. 'Azul' y *A. angustifolia* var. 'Lineño' y 'Cimarrón', fue del tipo sucesiva y la citocinesis del tipo centrífuga, por lo que las tétradas encontradas fueron principalmente tetragonales, y en menor cantidad decusadas, lineales, en forma de T y tetrahédricas.

Se identificaron diversas anormalidades en la microsporogénesis en *A. tequilana* var. ‘Azul’ y *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ y ‘Cimarrón’, tales como células con uno o varios puentes cromosómicos, células con uno o varios fragmentos acéntricos, cromosomas retrasados así como micronúcleos.

Se observaron mónadas, diadas, triadas y otros productos de la meiosis; las mónadas y triadas se presentaron tanto en *A. tequilana* var. ‘Azul’ como en las dos variedades de *A. angustifolia*, sin embargo, no se observaron diadas en *A. angustifolia* var. ‘Cimarrón’. Las frecuencias de mónadas y diadas fue mayor en *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ mientras que la frecuencia de triadas fue mayor en *A. angustifolia* var. ‘Cimarrón’.

Se observó la ausencia de la citocinesis II durante la meiosis, lo cual generó diadas y triadas; también se pudo observar la presencia de un huso mitótico anormal, posterior a la división reduccional de los bivalentes, lo que daba lugar a la formación triadas, con una microspora $2n$ y dos microsporas n . Estos mecanismos de formación de gametos $2n$ no se han descrito previamente en ninguna otra especie del género *Agave*.

El análisis morfológico del polen mostró la presencia de polen de diferente tamaño, el polen gigante se identificó como polen $2n$, con frecuencias de 1.2-3.2 % en las especies estudiadas. Se observó que la viabilidad de polen fue mayor en *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ y ‘Cimarrón’ con más del 90 %, mientras que en *A. tequilana* var. ‘Azul’ fue del 42 %.

Las diadas, triadas y polen gigante encontrados en las especies de *Agave*, indican la presencia de un mecanismo de restitución involucrado en la formación de gametos $2n$ en *A. tequilana* var. ‘Azul’ y *A. angustifolia* var. ‘Lineño’, el cual es equivalente a la Restitución de la Segunda División Meiótica (SDR).

Se obtuvieron líneas transformantes de *E. coli* DH5 α con fragmentos del 5S (cuatro colonias) y 18S (una colonia) de ADNr de *A. tequilana* var. ‘Azul’; las cuales se identificaron como secuencias del 5S y 18S de ADNr mediante un blastn en la base de datos del NCBI. Se

registraron en el GenBank la secuencia 2 del 5S y la secuencia del 18S con números de acceso: KF159808 y KF159807, respectivamente.

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) del 5S y 45S de ADNr de trigo, mostró que estos hibridan en todas las especies en un par de cromosomas pequeños y grandes, respectivamente.

El conteo de cromosomas en las especies del género confirmó que todas eran diploides con $2n = 60$, y el análisis cariotípico mostró que todas poseen un cariotipo bimodal con cinco cromosomas grandes y 25 cromosomas pequeños, una constricción secundaria en un cromosoma grande y diferentes fórmulas cariotípicas, y por ende, diferentes citotipos.

Los idiogramas obtenidos de los datos de FISH indicaron el número y posición de los *loci* de ADNr en las especies del género. Los *loci* del 5S se localizaron siempre en una región proximal en ambos brazos de un cromosoma pequeño mientras que el *locus* del 18S se localizó en una región intersticial de un cromosoma grande y asociado a la constricción secundaria.

La FISH simultánea del 5S y 45S de trigo junto a las secuencias de *A. tequilana* var. ‘Azul’ en las especies en estudio, permitió la identificación del mismo número de señales así como un traslape de las mismas, debido a la similitud existente entre las mismas.

El mapeo físico de las especies del género *Agave* mediante el uso de ADNr de trigo y *Agave* fue el siguiente: el 18S y 5S en *A. tequilana* var. ‘Azul’ se identificaron en los pares 1 y 10; en *A. cupreata*, en los pares 3 y 8; en *A. angustifolia* var. ‘Lineño’ en los pares 5 y 11 y en *A. angustifolia* var. ‘Cimarrón’, los pares 2 y 11.

IX. REFERENCIAS

Adams, KL (2007). Evolution of duplicate gene expression in polyploidy and hybrid plants. *J Hered* 98, 136-141.

Adams, KL y Wendel, JF (2005). Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr Opin Plant Biol* 8, 135-141.

Adams, SP, Leitch, IJ, Bennett, MD, Chase, MW y Leitch, AR (2000). Ribosomal DNA evolution and phylogeny in *Aloe* (Asphodelaceae). *Am J Bot* 87, 1578-1583.

Adams, KL, R Percifield y Wendel, JF (2004). Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. *Genetics* 168, 2217-2226.

Aleza, P, Juárez, J, Cuenca, J, Ollitrault, P y Navarro, L (2010). Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from 2x x 2x sexual hybridization and its application to extensive breeding programs. *Plant Cell Rep* 29, 1023-1034.

Álvarez de Zayas, A (1989). Distribución geográfica y posible origen de las Agavaceae. *Rev J Bot Nac (Cuba)* 9, 37-57.

APG III (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot J Linn Soc* 161, 105-121.

Arizaga, S y Ezcurra, E (1995). Insurance against reproductive failure in a semelparous plant: bulbil formation in *Agave macroacantha* flowering stalks. *Oecologia* 101, 329-334.

Arizaga, S y Ezcurra, E (2002). Propagation mechanism in *Agave macroacantha* (AGAVACEAE), a tropical arid-land succulent rosette. *Am J Bot* 89, 632-641.

Arizaga, S, Ezcurra, E, Peters E, de Arellano, FR y Vega, E (2000a). Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a Mexican tropical desert. I. Floral biology and pollination mechanisms. *Am J Bot* 87, 1004-1010.

Arizaga, S, Ezcurra, E, Peters E, de Arellano, FR y Vega, E (2000b). Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a Mexican tropical desert. II. The role of pollinators. *Am J Bot* 87, 1011-1017.

Axelrod, DI (1979). Age and origin of the Sonoran desert. *Occ Pap Cal Acad Sci* 132, 1-74.

Banerjee, S y Sharma, AK (1987). Cytophotometric estimation of nuclear DNA in different species and varieties of *Agave*. *Cytologia* 52, 85-90.

Banerjee, S y Sharma, AK (1988). Structural differences of chromosomes in diploid *Agave*. *Cytologia* 53, 415-420.

Barba-Gonzalez, R (2005). The use of $2n$ gametes for introgression breeding in Oriental \times Asiatic lilies. PhD Thesis Dissertation. Wageningen University.

Barba-Gonzalez, R, Lokker, AC, Lim, KB, Ramanna, MS y Van Tuyl, JM (2004). Use of $2n$ gametes for the production of sexual polyploids from sterile Oriental \times Asiatic hybrids of lilies (*Lilium*). *Theor Appl Genet* 109, 1125-1132.

Barba-Gonzalez, R, Lim, KB, Ramanna, MS, Visser, RGF y Van Tuyl, JM (2005). Occurrence of $2n$ gametes in the F1 hybrids of Oriental \times Asiatic lilies (*Lilium*): Relevance to intergenomic recombination and backcrossing. *Euphytica* 143, 67-73.

Barba-Gonzalez, R, Lim, KB, Zhou, S, Ramanna, MS y Van Tuyl JM. Interspecific Hybridization in Lily: The Use of $2n$ gametes in interspecific lily hybrids. JA Teixeira da Silva (2008) Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology Advances and Topical Issues. Vol. 5. Global Science Books Ltd.

Bastiaanssen, HJM, Ramanna, MS, Sawor, Z, Mincione, A, Steen, AVD y Jacobsen, E (1999). Pollen markers for gene-centromere mapping in diploid potato. *Theor Appl Genet* 93, 1040-1047.

Becerra Lopez-Lavalle, LA y Orjeda, G (2002). Occurrence and cytological mechanism of $2n$ pollen formation in a tetraploid accession of *Ipomoea batatas* (sweet potato). *J Hered* 93, 185-192.

Bell, G (1982). The masterpiece of Nature: the evolution and genetics of sexuality. Berkeley, CA. University of California Press.

Bentham, GD y Hooker, JD (1883). Genera Plantarum V. III London: Reeve and Co.

Birchler, JA, Auger, DL y Riddle, NC (2003). In search of the molecular basis of heterosis. *Plant Cell* 15, 2236-2239.

Boldrini, KR, Pagliarini, MS y do Valle, CB (2006) Abnormal timing of cytokinesis in microsporogenesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Paniceae). *J Genet* 85, 225-228.

Brandham, PE (1969a). Inversion heterozygosity and sub-chromatid exchanges in *Agave stricta*. *Chromosoma* 26, 270-286.

Brandham, PE (1969b). Chromosome behaviour in the *Aloineae*. I. The nature and significance of E-type bridges. *Chromosoma* 27, 201-215.

Brandham, PE y Doherty, MJ (1998). Genome size variation in the Aloaceae, an angiosperm family displaying karyotypic orthoselection. *Ann Bot-London* 82, 67-73.

Bretagnolle, F y Thompson, JD (1995). Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytol* 129, 1-22.

- Briones, VO (1994). Origen de los desiertos mexicanos. *Ciencia* 45, 263-279.
- Brown, SE, Stephens, JL, Lapitan, NLV y Knudson, DL (1999). FISH landmarks for barley chromosomes (*Hordeum vulgare* L). *Genome* 42, 274-281.
- Brownfield, L y Köhler, C (2010). Unreduced gamete formation in plants: mechanisms and prospects. *J Exp Bot* 62, 1659-1668.
- Cai, Q y Bullen, MR (1994). Analysis of genome-specific sequences in *Phleum* species: identification and use for study of genomic relationships. *Theor Appl Genet* 88, 831-837.
- Cai, X y Xu, SS (2007). Meiosis-driven genome variation in plants. *Curr Genomics* 8, 151-161.
- Camadro, EL (1994). Second meiotic division restitution (SDR) $2n$ pollen formation in diploid and hexaploid species of *Asparagus*. *Genet Resour Crop Ev* 41, 1-7.
- Carapetian, J y Rupert, EA (1977). Meiotic irregularities caused by interacting sterility genes in cultivated safflower (*Carthamus tinctorius*). *Can J Genet Cytol* 19, 103-109.
- Carputo, D, Barone, A y Frusciante, L (2000). $2n$ gametes in the potato: essential ingredients for breeding and germplasm transfer. *Theor Appl Genet* 101, 805-813.
- Castorena-Sánchez, I, Escobedo, RM y Quiroz, A (1991). New cytotaxonomical determinants recognized in six taxa of *Agave* in the sections *Rigidae* and *Sisilanae*. *Can J Bot* 69, 1257-1264.
- Cave, MS (1964). Cytological observations on some genera of the Agavaceae. *Madroño* 17, 163-169.

Chacón J, Sousa, A, Baeza, CM y Renner, SS (2012). Ribosomal DNA distribution and a genus-wide phylogeny reveal patterns of chromosomal evolution in *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae). *Am J Bot* 99, 1501-1512.

Clark, FJ (1940). Cytogenetic studies of divergent meiotic spindle formation in *Zea mays*. *Am J Bot* 27, 547-559.

Colomba, M, Vitturi, R, Volpe, N, Lannino, A y Zunino, M (2004). Karyotype, banding and rDNA FISH in the scarab beetle *Anoplotrupes stercorosus* (Coleoptera Scarabaeoidea: Geotrupidae). Description and comparative analysis. *Micron* 35, 717-720.

Comai, L (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat Rev Genet* 6, 836- 846.

Comai, L, Tyagi, AP, Winter, K, Holmes-Davis, R, Reynolds, SH, Stevens, Y y Bryers, B (2000). Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Cell* 12, 1551-1568.

Couteau, F, Belzile, F, Horlow, C, Grandjean, O, Vezon, D y Doutriaux, MP (1999). Random chromosome segregation without meiotic arrest in both male and female meiocytes of a *dmc1* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11, 1623-1634.

Crespel, L, Ricci, SC y Gudin, S (2006). The production of $2n$ pollen in rose. *Euphytica* 151, 155-164.

Crowhurst, RN y Gardner, RC (1991). A genome-specific repeat sequence from kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*). *Theor Appl Genet* 81, 71-78.

Cuadrado, A y Jouve, N (2010). Chromosomal detection of simple sequence repeats (SSRs) using non-denaturing FISH (ND-FISH). *Chromosoma* 119, 495-503.

Dahlgren, RMT, Clifford, HT y Yeo, PF (1985). The families of the monocotyledons. Structure, evolution and taxonomy. Berlín: Springer-Verlag.

Del Bosco, SF, Tusa, N y Conicella, C (1999). Microsporogenesis in a *Citrus* interspecific tetraploid somatic hybrid and its fusion parents. *Heredity* 83, 373-377.

de Souza, AM, Pagliarini, MS y Carraro, IM (1999). Abnormal spindles in second meiosis in Canola (*Brassica napus* and *Brassica campestris*). *Braz Arch Biol Technol* 42, 47-52.

DeWitte, A, Eeckhaut, T, Van Huylbroeck, J y Van Bockstaele, E (2009). Occurrence of viable unreduced pollen in a *Begonia* collection. *Euphytica*, 168, 81-94.

DeWitte A, Van Laere, K y Van Huylbroeck, J. Use of $2n$ gametes in plant breeding. IY. Abdurakhmonov (2011). Plant Breeding. InTech, Rijeka, Croatia.

D'Hont, A, Paget-Goy, A, Escoute, J y Careel, F (2000). The interspecific genome structure of cultivated banana *Musa* spp. revealed by genomic *in situ* hybridization. *Theor Appl Genet* 100, 177-183.

Doughty, LR (1936). Chromosome behavior in relation to genetics of *Agave*. I. Seven species of fibre *Agaves*. *J Genet* 33, 197-205.

Dubcovsky, J y Dvorak, J (2007). Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science* 316, 1862-1866.

Egolf, DR (1981). 'Helene' rose of sharon (althea). *HortScience* 16, 226-227.

Egolf, DR (1986). 'Minerva' rose of sharon (althea). *HortScience* 21, 1463-1464.

Egolf, DR (1988). 'Aphrodite' rose of sharon (althea). *HortScience* 23, 223.

Eguiarte, LE, Souza, V y Silva-Montellano, A (2000). Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Bol Soc Bot México* 66, 131-150.

Endlicher, IL (1841). *Enchiridion botanicum*. Leipzig: Engelmann.

Escobar-Guzmán, RE, Hernández, FZ, Vega, KG y Simpson, J (2008). Seed production and gametophyte formation in *Agave tequilana* and *Agave americana*. *Botany* 86, 1343-1353.

Evans, IJ, James, AM y Barnes, SR (1983). Organization and evolution of repeated DNA sequences in closely related plant genomes. *J Mol Biol* 170, 803-826.

Ferris, C, Callow, RS y Grey, AJ (1992). Mixed first and second division restitution in male meiosis of *Hierochloë odorata* (L.) Beauv (Holy grass). *Heredity* 69, 21-31.

Flavell, RB, Bennett, MD, Smith, JB y Smith, DB (1974). Genome size and proportion of repeated sequence DNA in plants. *Biochem Genet* 12, 257-269.

Furness, CA y Rudall, PJ (1999). Microsporogenesis in Monocotyledons. *Ann Bot-London* 84, 475-499.

Galasso, I, Saponetti, LS y Pignone, D (1998). Cytotaxonomic studies in *Vigna*. IV. Variation of the number of active and silent rDNA sites in *Vigna unguiculata* populations. *Caryologia* 51, 95-104.

Gallo, PH, Micheletti, PL, Boldrini, KR, Risso-Pascotto, C, Pagliarini, MS y Valle, CB (2007). A new meiotic mechanism for $2n$ gamete formation in *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae). *Euphytica* 154, 255-260.

García-Mendoza, A (2002). Distribution of *Agave* (Agavaceae) in Mexico. *Cact Suc J* 74, 177-188.

García-Mendoza, AJ (2004). Agaváceas. En: AJ García-Mendoza, MJ Ordóñez y M Briones-Salas (eds.), *Biodiversidad de Oaxaca*. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wild Life Fund, México, pp 159-169.

García-Mendoza, A (2007). Los Agaves de México. *Ciencias* 87, 14-23.

García-Mendoza, A y Galván, R (1995). Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Bol Soc Bot México* 56, 7-24.

García, S, Garnatje, T, Hidalgo, O, McArthur, ED, Siljak-Yakovlev, S y Valles, J (2007). Extensive ribosomal DNA (18S-5.8S-26S and 5S) colocalization in the North American endemic sagebrushes (subgenus *Tridentatae*, *Artemisia*, Asteraceae) revealed by FISH. *Plant Syst Evol* 267, 79-92.

García, S, Yoong-Lim, K, Chester, M, Garnatje, T, Pellicer, J, Vallès, J, Leitch, AR y Kovařík, A (2009). Linkage of 35S and 5S rRNA genes in *Artemisia* (family Asteraceae): first evidence from angiosperms. *Chromosoma* 118, 85-97.

Gentry, HS (1982). *Agaves of continental North America*. Tucson, Arizona, University of Arizona Press.

Gerlach, WL y Bedbrook, JR (1979). Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucl Acids Res* 7, 1869-1885.

Gerlach, WL y Dyer, TA (1980). Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucl Acids Res* 8, 4851-4865.

Gerstein, AC y Otto, SP (2009). Ploidy and the causes of genomic evolution. *J Hered* 100, 571-581.

Good-Avila, SV, Souza, V, Gaut, BS y Eguiarte, LE (2006). Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *P Natl Acad Sci USA* 103, 9124-9129.

Griffiths, AJF, Wessler, SR, Lewontin, RC, Gelbart, WM, Miller, JH y Suzuki, DT (2005). *An Introduction to Genetic Analysis*. W.H. Freeman. Eighth Edition.

Hahn, SK, Bai, KV y Asiedu, R (1990). Tetraploids, triploids and $2n$ pollen from diploid interspecific crosses with cassava. *Theor Appl Genet* 79, 433-439.

Halverson, K, Heard, SB, Nason, JD y Stireman, JO (2008). Origins, distribution and local co-occurrence of polyploidy cytotypes in *Solidago altissima* (Asteraceae). *Am J Bot* 95, 50-58.

Hanson, RE, Zhao, XP, Islam-Faridi, MN, Paterson, AH, Zwick, MS, Crane, CF, McKnight, TD, Stelly, DM y Price, HJ (1998). Evolution of interspersed repetitive elements in *Gossypium* (Malvaceae). *Am J Bot* 85, 1364-1368.

Harlan, JR y deWet, JMJ (1975) On Ö. Winge and a prayer: the origins of polyploidy. *Bot Rev* 41, 361-690.

Hauser, EJP y Morrison, JH (1964). The cytochemical reduction of nitro tetrazolium as an index of pollen viability. *Am J Bot* 51, 748-752.

He, P, Friebe, BR, Gill, BS y Zhou, JM (2003). Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat. *Plant Mol Biol* 52, 401-414.

Hemleben, V (1993). Repetitive and highly repetitive DNA components as molecular markers for evolutionary studies and in plant breeding. *J Council Sci Res Integration*, Compilers International, Varanasi, India. *Molecular Genetics (Life Science Advances)* 1, 173-185.

Heslop-Harrison, JS (2000). Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. *Plant Cell* 12, 617-635.

Hizume, H, Shibata, F, Matsusaki, Y y Garajova, Z (2002). Chromosome identification and comparative karyotypic analyses of four *Pinus* species. *Theor Appl Genet* 105, 491-497.

Hoang, T, Dube, SK, Liang, GH y Kung, SD (1991). Possible repetitive DNA markers for *Eusorghum* and *Parasorghum* and their potential use in examining phylogenetic hypotheses on the origin of *Sorghum* species. *Genome* 34, 241-250.

Hutchinson, J (1934). The families of flowering plants. Vol II. Monocotyledons. London, The Macmillan Co.

Hutchinson, J (1959). The families of flowering plants Vol. II. Monocotyledons 2a ed. Oxford Clarendon Press.

Imery-Buiza, J (2007). Inestabilidad cariológica durante la formación de células madres del polen en *Aloe vera* (Aloaceae). *Rev Biol Trop (Int J Trop Biol)* 55, 805-813.

Jansen, RC y Den Nijs, APM (1993). A statistical mixture model for estimating the proportion of unreduced pollen grain in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) via the size of pollen grain. *Euphytica* 70, 205-215.

Ji, Y, De Donato, M, Crane, CF, Raska, WA, Islam-Faridi, MN, McKnight, TD, Price, HJ y Stelly, DM (1999). New ribosomal RNA gene locations in *Gossypium hirsutum* mapped by meiotic FISH. *Chromosoma* 108, 200-207.

Jiang, J y Gill, BS (1994). New 18S.26S ribosomal RNA gene *loci*: chromosomal landmarks for the evolution of polyploidy wheats. *Chromosoma* 103, 179-185.

Jiang, H, Wang, FF, Wu, YT, Zhou, X, Huang, XY, Zhu, J, Gao, JF, Dong, RB, Cao, KM y Yang, ZN (2009). Multipolar spindle1 (MPS1), a novel coiled-coil protein of *Arabidopsis thaliana*, is required for meiotic spindle organization. *Plant J* 59, 1001-1010.

Kamstra, SA, Ramanna, MS, De Jeu, MJ, Kuipers, AGJ y Jacobsen, E (1999). Homoeologous chromosome pairing in the distant hybrid *Alstroemeria aurea* × *A. inodora* and the genome composition of its backcross derivatives determined by fluorescence *in situ* hybridization with species-specific probes. *Heredity* 82, 69-78.

Kato, A, Lamb, JC y Birchler, JA (2004). Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize. *P Natl Acad Sci USA* 101, 13554-13559.

Kato, A, Albert, PS, Vega, JM y Birchler, JA (2006). Sensitive FISH signal detection in maize using directly labeled probes produced by high concentration DNA polymerase nick translation. *Biotech Histochem* 81, 71-78.

Khaliq, I, Awais-Khan, M y Pearce, S (2012). Ty1-Copia retrotransposons are heterogeneous, extremely high copy number and are major players in the genome organization and evolution of *Agave tequilana*. *Genet Resour Crop Ev* 59, 575-587.

Koo, DH, Plaha, P, Lim, YP, Hur, Y y Bang, JW (2004). A high-resolution karyotype of *Brassica rapa* ssp. *Pekinensis* revealed by pachytene analysis and multicolor fluorescence *in situ* hybridization. *Theor Appl Genet* 109, 1346-1352.

Kotseruba, V, Gernand, D, Meister, A y Houben, A (2003). Uniparental loss of ribosomal DNA in the allotetraploid grass *Zingeria trichopoda* ($2n = 8$). *Genome* 46, 156-163.

Kubis, S, Schmidt, T y Heslop-Harrison, JS (1998). Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. *Ann Bot-London* 82, 45-55.

Lamb, JC y Birchler, JA (2006). Retroelement genome painting: cytological visualization of retroelement expansions in the genera *Zea* and *Tripsacum*. *Genetics* 173, 1007-1021.

Lavania, UC, Basu, AS, Srivastava, S, Mukai, Y y Lavania, S (2005). *In situ* chromosomal localization of rDNA sites in “safed musli” *Chlorophytum* Ker-Gawl and their physical measurement by fiber FISH. *J Hered* 96, 155-160.

Leitch, AR y Leitch, IJ (2008). Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science* 320, 481-483.

Li, L y Arumuganathan, K (2001). Physical mapping of sorted chromosomes 45S and 5S rDNA on maize metaphase and by FISH. *Hereditas* 134, 141 -145.

Lim, KY, Matyásek, R, Lichtenstein, CP y Leitch, AR (2000). Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section *Tomentosae*. *Chromosoma* 109, 245-258.

Lim, KB, Ramanna, MS, de Jong, JH, Jacobsen, E y Van Tuyl, JM (2001). Indeterminate meiotic restitution (IMR): a novel type of meiotic nuclear restitution mechanism detected in interspecific lily hybrids by GISH. *Theor Appl Genet* 103, 219-230.

Lim, KB, Shen, TM, Barba-Gonzalez, R, Ramanna, MS y Van Tuyl, JM (2004). Occurrence of SDR $2n$ -gametes in *Lilium* hybrids. *Breeding Sci* 54, 13-18.

Lima-Cardoso, A, Holanda-Sales, KA, Yoshiko-Nagamachi, C, Pieczarka, JC y Rodrigues-Noronha, RC (2013). Comparative cytogenetics of two species of genus *Scobinancistrus* (Siluriformes, Loricariidae, Ancistrini) from the Xingu River, Brazil. *Comp Cytogenet* 7, 43-51.

Liu, B y Davis, TM (2011). Conservation and loss of ribosomal RNA gene sites in diploid and polyploid *Fragaria* (Rosaceae). *BMC Plant Biol* 11, 157.

Liu, ZL, Zhang, D, Wang, XQ, Ma, XF y Wang, XR (2003). Intragenomic and interspecific 5S rDNA sequence variation in five Asian pines. *Am J Bot* 90, 17-24.

Lukens, LN, Pires, JC, Leon, E, Vogelzang, R, Oslach, L y Osborn, T (2006). Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids. *Plant Physiol* 140, 336-348.

Lyrene, P, Vorsa, N y Ballington, J (2003). Polyploidy and sexual polyploidization in the genus *Vaccinium*. *Euphytica* 133, 27-36.

Magnard, JL, Yang, M, Chen, YCS, Leary, M y McCormick, S (2001). The *Arabidopsis* gene *tardy asynchronous meiosis* is required for the normal pace and synchrony of cell division during male meiosis. *Plant Physiol* 127, 1157-1166.

McKain, MR, Wickett, N, Zhang, Y, Ayyampalayam, S, McCombie, WR, Chase, MW, Pires, JC, dePamphilis, CW y Leebens-Mack, J (2012). Phylogenomic analysis of transcriptome data elucidates co-occurrence of a paleopolyploid event and the origin of bimodal karyotypes in Agavoideae (Asparagaceae). *Am J Bot* 99, 397-406.

McKelvey, DS y Sax, K (1933). Taxonomic and cytological relationship of *Yucca* and *Agave*. *J Arnold Arbor* 14, 76-81.

Mendiburu, AO y Peloquin, SJ (1977). The significance of $2n$ gametes in potato breeding. *Theor Appl Genet* 49, 53-61.

Mishima, M, Ohmido, N, Fukui, K y Yahara, T (2002). Trends in site-number change of rDNA *loci* during polyploid evolution in *Sanguisorba* (Rosaceae). *Chromosoma* 110, 550-558.

Mizuochi, H, Marasek, A y Okazaki, K (2007). Molecular cloning of *Tulipa fosteriana* rDNA and subsequent FISH analysis yields cytogenetic organization of 5S rDNA and 45S rDNA in *T. gesneriana* and *T. fosteriana*. *Euphytica* 155, 235-248.

Mok, DWS y Peloquin, SJ (1975a). The inheritance of three mechanisms of diplandroid ($2n$ pollen) formation in diploid potatoes. *Heredity* 35, 295-302.

Mok, DWS y Peloquin, SJ (1975b). Three mechanisms of $2n$ pollen formation in diploid potatoes. *Can J Genet Cytol* 17, 217-225.

Molina-Freaner, F y Eguiarte, LE (2003). The pollination biology of two paniculate agaves (Agavaceae) from Northwestern Mexico: contrasting roles of bats as pollinators. *Am J Bot* 90, 1016-1024.

Moreno-Salazar, SF, Esqueda, M, Martínez, J y Palomino, G (2007). Tamaño del genoma y cariotipo en *Agave angustifolia* y *A. rhodacantha* de Sonora, México. *Rev Fitotec Mex* 30, 13-23.

Mukai, Y, Endo, TR y Gill, BS (1991) Physical mapping of the 18S.26S rRNA multigene family in common wheat: Identification of a new *locus*. *Chromosoma* 100, 71-78.

Nacry, P, Mayer, U y Jürgens, G (2000). Genetic dissection of cytokinesis. *Plant Mol Biol* 43, 719-733.

Naganowska, B y Zielinska, A (2002). Physical mapping of 18S-25S rDNA and 5S rDNA in *Lupinus* via fluorescent *in situ* hybridization. *Cell Mol Biol Lett* 7, 665-670.

Newman, LJ (1966). Bridge and fragment aberrations in *Podophyllum peltatum*. *Genetics* 53, 55-63.

Okazaki, K, Kurimoto, K, Miyajima, I, Enami, A, Mizuochi, H, Matsumoto, Y y Ohya, H (2005). Induction of $2n$ pollen by arresting the meiotic process with nitrous oxide gas. *Euphytica* 143, 101-114.

Olsen, RT (2006). Utilizing polyploidy for developing improved nursery crops: restoring fertility in wide hybrids, limiting fertility of invasive species, embryo culture of triploids, pest resistance, and inheritance of ornamental traits. PhD Thesis Dissertation. North Carolina State University.

Orjeda, G, Freyre, R y Iwanaga, M (1990). Production of $2n$ pollen in diploid *Ipomoea trifida*, a putative wild ancestor of sweetpotato. *J Hered* 81, 462-467.

Otto, SP y Whitton, J (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annu Rev Genet* 34, 401-37.

Pagliarini, MS, Takayama, SY, de Freitas, PM, Carraro, LR, Adamowski, EV, Silva, N y Batista, LAR (1999). Failure of cytokinesis and $2n$ gamete formation in Brazilian accessions of *Paspalum*. *Euphytica* 108, 129-135.

Palacios, R y Rzedowski, J (1993). Estudio palinológico de las floras fósiles del mioceno inferior y principios del mioceno medio de la región de Pichucalco, Chiapas, México. *Acta Bot Mex* 24, 1-96.

Palomino, G, Martínez, J y Méndez, I (2005). Citotipos en *Agave angustifolia* Haw. determinados por citometría de flujo y análisis de sus cariotipos. *Rev Int Contam Ambient* 21, 49-54.

Palomino, G, Martínez, J y Méndez, I (2008). Karyotype studies in cultivars of *Agave tequilana* Weber. *Caryologia* 61, 144-153.

Palomino, G, Martínez, J y Méndez, I (2010). Análisis del tamaño del genoma y cariotipo de *Agave aktites* Gentry (Agavaceae) de Sonora, México. *Rev Mex Biodivers* 81, 655-662.

Palomino G, Martínez J, Cepeda-Cornejo V y Pimienta-Barrios, E (2012). Nuclear genome size and cytotype analysis in *Agave cupreata* Trel. & Berger (Agavaceae). *Caryologia* 65, 281-294.

Parisod, C, Holderegger, R y Brochmann, C (2010). Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytol* 186, 5-17.

Parrot, A y Smith, RR (1984). Production of $2n$ pollen in red clover. *Crop Sci* 24, 469-472.

Pathogenic Fungi Database (PFDB): http://www.pfdb.net/myhtml/genosp_dermato.html.
Accesado día el 21/04/2013.

Pax, F y Hoffman, K (1930). Amaryllidaceae. En: Engler A. ed. Pflanzenreich. 391-430.
Leipzig: Engelmann.

Peloquin, SJ, Boiteaux, L y Carputo, D (1999). Meiotic mutants in the potato - valuable variants. *Genetics* 153, 1493-1499.

Penet, L, Nadot, S, Ressayre, A, Forchioni, A, Dreyer, L y Gouyon, PH (2005). Multiple developmental pathways leading to a single morph: monosulcate pollen (examples from the Asparagales). *Ann Bot-London* 95, 331-343.

Penet, L, Laurin, M, Gouyon, PH y Nadot, S (2007). Constraints and selection: insights from microsporogenesis in Asparagales. *Evol Dev* 9, 460-471.

Pfeiffer, TW y Bingham, ET (1983). Abnormal meiosis in alfalfa, *Medicago sativa*: cytology of $2n$ egg and $4n$ pollen formation. *Can J Genet Cytol* 25, 107-112.

Pinhal, D, Gadig, OBF, Wasko, AP, Oliveira, C, Ron, E, Foresti, F y Martins, C (2008). Discrimination of shark species by simple PCR of 5S rDNA repeats. *Genet Mol Biol* 31, 361-365.

Pinkava, DJ y Baker, MA (1985). Chromosome and hybridization studies of *Agaves*. *Des. Plant* 7, 93-100.

Pires, JC, Lim, KY, Kovarík, A, Matyásek, R, Boyd, A, Leitch, AR, Leitch, IJ, Bennett, MD, Soltis, PS y Soltis, DE (2004). Molecular cytogenetic analysis of recently evolved *Tragopogon* (Asteraceae) allopolyploids reveal a karyotype that is additive of the diploid progenitors. *Am J Bot* 91, 1022-1035.

Piven, NM, Barredo-Pool, FA, Borges-Argáez, IC, Herrera-Alamillo, MA, Mayo-Mosqueda, A, Herrera-Herrera, JL y Robert, ML (2001). Reproductive biology of henequén (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *Agave angustifolia* (Agavaceae). I. Gametophyte development. *Am J Bot* 88, 1966-1976.

Quinn, AA, Mok, DWS y Peloquin, SJ (1974). Distribution and significance of diplandroids among the diploid *Solanums*. *Am Potato J* 51, 16-21.

Ramanna, MS y Jacobsen, E (2003). Relevance of sexual polyploidization for crop improvement - A review. *Euphytica* 133, 3-18.

Ramanna, MS, Kuipers, AGJ y Jacobsen, E (2003). Occurrence of numerically unreduced ($2n$) gametes in *Alstroemeria* interspecific hybrids and their significance for sexual polyploidisation. *Euphytica* 133, 95-106.

Ramsey, J (2007). Unreduced gametes and neopolyploids in natural populations of *Achillea borealis* (Asteraceae). *Heredity* 98, 143-150.

Ramsey, J y Schemske, DW (1998). Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu Rev Ecol Syst* 29, 467-501.

Ramsey, J y Schemske, DW (2002). Neopolyploidy in flowering plants. *Annu Rev Ecol Syst* 33, 589-639.

Ray, M y Tokach, MK (1992). Cytology of $2n$ pollen formation in diploid crested wheatgrass, *Agropyron cristatum*. *Crop Sci* 32, 1361-1365.

Rayburn, AL y Gill, BS (1985). Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. *J Hered* 76, 78-81.

Rice, WR y Chippindale, AK (2001). Sexual recombination and the power of natural selection. *Science* 294, 555-559.

Risso-Pascotto, C, Pagliarini, MS, Borges do Valle, C y Mendes-Bonato, AB (2003). Chromosome number and microsporogenesis in a pentaploid accession of *Brachiaria brizantha* (Gramineae). *Plant Breeding* 122, 136-140.

Robert, ML, Lim, KY, Hanson, L, Sánchez-Teyer, F, Bennett, MD, Leitch, AR y Leitch, IJ (2008). Wild and agronomically important *Agave* species (Asparagaceae) show proportional increases in chromosome number, genome size, and genetic markers with increasing ploidy. *Bot J Linn Soc* 158, 215-222.

Roberts, AV (2007). The use of bead beating to prepare suspensions of nuclei for flow cytometry from fresh leaves, herbarium leaves, petals and pollen. *Cytometry* 71, 1039-1044.

Rocha, M, Valera, A y Eguiarte, LE (2005). Reproductive ecology of five sympatric *Agave Littaea* (Agavaceae) species in central Mexico. *Am J Bot* 92, 1330-1341.

Rocha, MS, Good-Avila, V, Molina-Freaner, F, Arita, H, Castillo, A, García-Mendoza, A, Silva-Montellano, A, Gaut, BS, Souza, V y Eguiarte, LE (2006). Pollination biology and adaptive radiation of Agavaceae, with special emphasis in the genus *Agave*. *Aliso* 22, 329-344.

Ruvalcaba-Ruiz, D y Rodríguez-Garay, B (2002). Aberrant meiotic behavior in *Agave tequilana* Weber var. Azul. *BMC Plant Biol* 2, 10-14.

Sanford, JC. Ploidy manipulations. Janick, J y Moore, JN (1983). Methods in fruit breeding. Perdue University Press.

Sala, CA, Camadro, EL, Salaberry, MT y Mendiburu, AO (1989). Cytological mechanism of $2n$ pollen formation and unilateral sexual polyploidization in *Lolium*. *Euphytica* 43, 1-6.

Schmidt, T y Heslop-Harrison, JS (1996). High-resolution mapping of repetitive DNA by *in situ* hybridization: molecular and chromosomal features of prominent dispersed and discretely localized DNA families from the wild beet species *Beta procumbens*. *Plant Mol Biol* 30, 1099-1114.

Schubert, I y Wobus, U (1985). *In situ* hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* 92, 143-148.

Serrano-Casas, H, Solano, E y Terrazas, T (2011). Anatomía floral comparativa del género *Polianthes* (Agavaceae). *Rev Mex Biodivers* 82, 145-152.

Shishido, R, Sano, Y y Fukui, K (2000). Ribosomal DNAs: an exception to the conservation of gene order in rice genomes. *Mol Gen Genet* 263, 586-591.

Siddiqi, I, Ganesh, G, Grossniklaus, U y Subbiah, V (2000). The *dyad* gene is required for progression through female meiosis in *Arabidopsis*. *Development* 127, 197-207.

Silva-Montellano, A y Eguiarte, LE (2003). Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. I. Floral characteristics, visitors, and fecundity. *Am J Bot* 90, 377-387.

Siroky, J, Lysak, MA, Dolozel, J, Kejnovsky, E y Vyskot, B (2001). Heterogeneity of rDNA distribution and genome size in *Silene* spp. *Chromosome Res* 9, 387-393.

Slauson, LA (2000). Pollination biology of two chiropterophilous agaves in Arizona. *Am J Bot* 87, 825-836.

Small, RL, Ryburn, JA y Wendel, JF (1999). Low levels of nucleotide diversity at homeologous *Adh loci* in allotetraploid cotton (*Gossypium L.*). *Mol Biol Evol* 16, 491-501.

Specht, T, Szymanski, M, Barciszewska, MZ, Barciszewski, J y Erdmann, V (1997). Compilation of 5S rRNA and 5S rRNA gene sequences. *Nucleic Acid Res* 25, 96-97.

Stebbins, GL (1950). Variation and evolution in plants. New York: Columbia University Press.

Tai, W (1970). Multipolar meiosis in diploid crested wheatgrass, *Agropyron cristatum*. *Am J Bot* 57, 1160-1169.

Takhtajan, AL (1980). Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta). *Bot Rev* 46, 225-359.

Taschetto, OM y Pagliarini, MS (2003). Occurrence of $2n$ and jumbo pollen in the Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata* and *P. tuberosa*). *Euphytica* 133, 139-145.

Tavoletti, S, Mariani, A y Veronesi, F (1991a). Cytological analysis of macro- and microsporogenesis of a diploid alfalfa clone producing male and female $2n$ gametes. *Crop Sci* 31, 1258-1263.

Tavoletti, S, Mariani, A y Veronesi, F (1991b). Phenotypic recurrent selection for $2n$ pollen and $2n$ egg production in diploid alfalfa. *Euphytica* 57, 97-102.

te Beest, M, Le Roux, JJ, Richardson, DM, Brysting, AK, Suda, J, Kubesová, M y Pysek, P (2011). The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Ann Bot-London* 109, 19- 45.

Tel-Zur, N, Abbo, S y Mizrahi, Y (2005). Cytogenetics of semi-fertile triploid and aneuploid intergeneric vine cacti hybrids. *J Hered* 96, 124-131.

Thiede, J (2001). Agavaceae. In U. Eggli (ed.). Illustrated handbook of Succulent plants: Monocotyledons. Springer-Verlag, Berlin. 5-102.

Thompson, JD y Lumaret, R (1992). The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. *Trends Ecol Evol* 7, 302-7.

Tilquin, JP, de Brouwer, K y Horvat, F (1984). Unusual cytological patterns in microsporogenesis in a cultivar of *Fuchsia*. 1. Multiple spindle. *Theor Appl Genet* 67, 413-417.

Udall, JA y Wendel, JF (2006). Polyploidy and crop improvement. *Crop Sci* 46, S3-S14.

Valdivia, ER, Sampedro, J, Lamb, JC, Chopra, S y Cosgrove, DJ (2007). Recent proliferation and translocation of pollen group 1 allergen genes in the maize genome. *Plant Physiol* 143, 1269-1281.

Van Laere, K, DeWitte, A, Van Huylenbroeck, J y Van Bockstaele, E (2009). Evidence for the occurrence of unreduced gametes in interspecific hybrids of *Hibiscus*. *J Hortic Sci Biotech* 84, 240-247.

Van Tuyl, JM, Lim, KB y Ramanna, MS (2002). Interspecific hybridization and introgression In: Vainstein A (ed.), *Breeding for ornamentals: Classical and Molecular Approaches*, Kluwer Academic Publishers pp. 85-103.

Van Tuyl, JM, Barba-Gonzalez, R, Van Silfhout, AA, Lim, K-B y Ramanna, MS (2005). Meiotic recombination in five different interspecific *Lilium* hybrids. *Acta Hort* 673, 99-105.

Veilleux, R (1985). Diploid and polyploid gametes in crop plants: mechanisms of formation and utilization in plant breeding. In: Janick J (ed) *Plant Breeding Reviews Vol 3*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, pp 253-288.

Veronesi, F, Mariani, A y Bingham, ET (1986). Unreduced gametes in diploid *Medicago* and their importance in alfalfa breeding. *Theor Appl Genet* 72, 17-41.

Vigfússon, E (1970). On polyspermy in the sunflower. *Hereditas* 64, 1-52.

Vignoli, L (1936) Cariologia del genere *Agave*. *Lay R Ist Bot Palermo* 7, 176-217.

Vosa, CG (2005). On chromosome uniformity, bimodality and evolution in the tribe Aloineae (Asphodelaceae). *Caryologia* 58, 83-85.

Wagenvoort, M y Den Nijs, APM (1992). Implications of $2n$ pollen for breeding tetraploid perennial ryegrass. In: Mariani A, Tavoletti S (eds) Gametes with somatic chromosome number in the evolution and breeding of polyploid polysomic species: achievements and perspectives. Tipolitografia Porziuncola, Perugia, Italy, pp 5-14.

Wang, J, Tian, L, Madlung, A, Lee, HS, Chen, M, Lee, JJ, Watson, B, Kagochi, T, Comai, L y Chen, ZJ (2004). Stochastic and epigenetic changes of gene expression in *Arabidopsis* polyploids. *Genetics* 167, 1961-1973.

Wang, J, Kang, X y Zhu, Q (2010). Variation in pollen formation and its cytological mechanism in an allotriploid white poplar. *Tree Genet Genomes* 6, 281-290.

Wendel, JF, Schnabel, A y Seelanan, T (1995). Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *P Natl Acad Sci USA* 92, 280-284.

Werner, JE y Peloquin, SJ (1987). Frequency and mechanisms of $2n$ egg formation in haploid tuberosum-wild species F1 hybrids. *Am J Potato Res* 64, 641-654.

Werner, JE y Peloquin, SJ (1991). Occurrence and mechanisms of $2n$ egg formation in $2x$ potato. *Genome* 34, 975-982.

Wolfe, KH (2001). Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nat Rev Genet* 2, 333-341.

Wu, H, Ramanna, MS, Arens, P y Van Tuyl, JM (2011) Genome constitution of *Narcissus* variety, 'Tête-à-Tête', analysed through GISH and NBS profiling. *Euphytica* 181, 285-292.

Xu, S y Joppa, LR (2000). First division restitution in hybrids of Langdon durum disomic substitution lines with rye and *Aegilops squarrosa*. *Plant Breeding* 119, 233-241.

Xu, LQ, Zhang, QL y Luo, ZR (2008) Occurrence and cytological mechanism of $2n$ pollen formation in Chinese *Diospyros* spp. (Ebenaceae) staminate germplasm. *J Hortic Sci Biotech* 83, 668-672.

Yan, G, Ross-Ferguson, A, McNeilage, MA y Murray, BG (1997). Numerically unreduced ($2n$) gametes and sexual polyploidization in *Actinidia*. *Euphytica* 96, 267-272.

Yang, M, Hu, Y, Lodhi, M, McCombie, WR y Ma, H (1999). The *Arabidopsis SKP1-LIKE1* gene is essential for male meiosis and may control homologue separation. *P Natl Acad Sci USA* 96, 11416-11421.

Yu, W, Lamb, JC, Han, F y Birchler, JA (2007). Cytological visualization of transposable elements and their transposition pattern in somatic cells of maize. *Genetics* 175, 31-39.

Zhang, Z y Kang, X (2010). Cytological characteristics of numerically unreduced pollen production in *Populus tomentosa* Carr. *Euphytica* 173, 151-159.

Zhang, D y Sang, T (1999). Physical mapping of ribosomal RNA genes in Peonies (*Paeonia*, Paeoniaceae) by fluorescent *in situ* hybridization: implications for phylogeny and concerted evolution. *Am J Bot* 86, 735-740.

Zentgraf, U, King, K y Hemleben, V (1992). Repetitive sequences are valuable as molecular markers in studies of phylogenetic relationships within the genus *Cucumis*. *Acta Bot Neerl* 41, 397-406.

X. ANEXO 1

α -Bromonaftaleno al 0.1 %: Mezclar 10 μ l de α -bromonaftaleno saturado en 10 ml de agua destilada.

Aceto-orceína al 1 %: Disolver 2.25 g de orceína en 100 ml de ácido acético glacial. Hervir lentamente por 2-3 h, se deja enfriar a temperatura ambiente y se filtra. Almacenar en botella oscura. Para su uso, mezclar 4.5 ml de la solución con 5.5 ml de agua destilada.

Ácido acético al 45 %: Disolver 45 ml de ácido acético glacial en 55 ml de agua destilada.

Amortiguador TAE 10X: Disolver 48.42 g de Tris base, 11.4 ml de ácido acético glacial y 3.7 g de EDTA disódico en 800 ml de agua desionizada. Aforar a 1 l. Ajustar el pH a 8.2.

Anti-dig fluoresceína: Diluir la solución stock (200 μ g/ml) 1:10 (v/v) en blockbuffer.

Anti-fluoresceína: Diluir la solución stock (1 mg/ml) 1:250 (v/v) en blockbuffer.

Anti-estreptavidina biotilada (cabra): Diluir la solución stock (0.5 mg/ml) 1:50 (v/v) en blockbuffer.

Azul de anilina al 1 % en lactofenol: Disolver 20 g de fenol (cristales) en 20 ml de ácido láctico (85% v/v), 40 ml de glicerina y 20 ml de agua destilada mediante un calentamiento ligero y una vez fría, se agrega el azul de anilina. Se deja reposar 24 h y se filtra.

Blockbuffer: Reactivo de bloqueo (Boehringer) al 1% en buffer 1.

Buffer 1: Tris HCl 0.1M + cloruro de sodio 0.15 M, con un pH = 7.5.

Buffer de citratos: Mezclar la solución de citrato trisódico 10 mM con la solución de ácido cítrico 10 mM hasta obtener un pH = 4.5.

Buffer de CTAB al 10%: Disolver 10 g de CTAB y 4.1 g de NaCl en agua miliQ.

Buffer de extracción CTAB-PVP al 2 %: Disolver 2 g de CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) en Tris-HCl 100mM (pH 8.0), EDTA 20 mM (pH 8.0), NaCl 1.4 M y PVP (polivinilpirrolidona) al 1 %.

Buffer de precipitación de CTAB al 1 %: Disolver 1 g de CTAB en Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) y EDTA 10 mM (pH 8.0).

Buffer TE 0.1: Mezclar las soluciones de Tris-HCl 1 mM (pH 8.0) y EDTA 0.1 mM (pH 8.0).

Buffer TE alto en sales: Mezclar las soluciones de Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM (pH 8.0) y NaCl (1 M).

Cloroformo:alcohol isoamílico: Mezclar 24 volúmenes de cloroformo con 1 volumen de alcohol isoamílico.

DAPI (4'6-diamino-2-fenilindol): Solución stock de 100 µg/ml en agua miliQ. Para su uso, diluir el stock a 1 µg/ml en solución SSC 2X.

Dextrán sulfato sódico al 50 %: Disolver 5 g de dextrán sulfato sódico en 10 ml de agua miliQ.

Dodecilsulfato de sodio al 10 %: Disolver 10 g de dodecilsulfato de sodio en 100 ml de agua miliQ.

EDTA 0.5 M: Disolver 18.612 g de EDTA en 70 ml de agua destilada y se ajusta el pH a 8.0 con NaOH 5M y se afora a 100 ml. Se autoclavea la solución y se almacena a 4 °C.

Enzimas pectiolíticas: Pectoliasa Y23 al 0.2 % (p/v) + celulasa RS al 0.2 % (p/v) + citohelicasa al 0.2 % (p/v) en buffer de citratos 10 mM con pH = 4.5.

Estreptavidina Cy3: Diluir la solución stock (1 mg/ml) en blockbuffer 1:250 (v/v).

Estreptavidina Alexa-Fluor 546: Diluir la solución stock (1 mg/ml) 1:50 (v/v) en blockbuffer.

Etanol al 70 %, 80 %, 90 %, 96 %: Diluir el etanol absoluto v/v en agua.

Fluoresceína anti-conejo (cabra): Diluir la solución stock (1.5 mg/ml) 1:75 (v/v) en blockbuffer.

Fluoresceína anti-dig: Diluir a 200 µg/ml la solución stock de fluoresceína anti-dig 1:10 (v/v) en blockbuffer.

Fluoresceína anti-oveja (conejo): Diluir la solución stock (1.5 mg/ml) 1:75 (v/v) en blockbuffer.

Formamida: Utilizar formamida desionizada.

Gel de agarosa al 1 % con bromuro de etidio: Disolver 1 g de agarosa en 100 ml del amortiguador TAE 1X y agregar bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml de gel.

Medio LB líquido: Para 1 l de medio, disolver 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl y 10 g de triptona en 950 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5M y aforar a 1 l.

Esterilizar en autoclave por 20 min a 103400 Pascales. Dejar enfriar hasta ~55 °C para agregar el antibiótico de selección, si fuera necesario.

Medio LB sólido: Para 1 l de medio, disolver 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl y 10 g de triptona y 15 g de bactoagar en 950 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5M y aforar a 1 l. Esterilizar en autoclave por 20 min a 103400 Pascales. Dejar enfriar hasta ~55 °C para agregar el antibiótico de selección, si fuera necesario.

Medio SOC: Para 1 l de medio, disolver 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 0.5 g de NaCl en 950 ml de agua destilada. Agregar 10 ml de KCl 250 mM. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5 M y llevar el volumen a 980 ml. Esterilizar por 20 min a 103400 Pascales. Dejar enfriar hasta ~55 °C y agregar 10 ml de MgCl₂ 1M (autoclaveado) y 10 ml de glucosa 2M esterilizada por filtración.

Paraformaldehído al 4 %: Disolver 4 g de paraformaldehído en 60 ml de agua miliQ a 60 °C hasta que el color lechoso desaparezca y agregar 200 µl de NaOH 10M. Ajustar el volumen a 100 ml y dejar enfriar a temperatura ambiente.

Pepsina: Solución stock de 500 µg/ml en HCl 0.01 M. La solución de trabajo se obtiene al diluir el stock 1:100 en HCl 0.01M.

RNasa A: Disolver 100 mg de RNasa A en 10 ml de Tris HCl 10 mM (pH = 7.5) y NaCl 15 mM. Hervir durante 15 min y dejar enfriar. Almacenar a - 20 °C.

SSC 20X: Cloruro de sodio 3M + citrato trisódico 0.3M (pH = 7.0). La soluciones 2X y 0.1X se obtienen al diluir la solución concentrada con agua miliQ.