

## Estudio de los cromosomas mitóticos y meióticos del sotol (*Dasyllirion cedrosanum* Trel.)

### Study of the mitotic and meiotic chromosomes of sotol (*Dasyllirion cedrosanum* Trel.)

Hernández-Quintero JD<sup>1</sup>, MH Reyes-Valdés<sup>2</sup>, DV Mendoza-Rodríguez<sup>3</sup>, M Gómez-Martínez<sup>2</sup>, R Rodríguez-Herrera<sup>4</sup>

**Resumen.** El género *Dasyllirion* es un grupo de plantas típicas del Desierto Chihuahuense, perennes, de un comportamiento sexual dioico y denominadas comúnmente sotoles. Es un género poco estudiado desde el punto de vista biológico y se desconocen las bases de su dinámica reproductiva. En este trabajo se estudió el número cromosómico y el comportamiento meiótico de *Dasyllirion cedrosanum* en el municipio de Saltillo, Coahuila, una localidad del noreste de México. Para la preparación de cromosomas mitóticos se utilizó una técnica basada en un tratamiento enzimático con pectoliasa y celulasa, así como tinción con acetocarmín. Para el estudio meiótico se recolectaron botones florales masculinos, se fijaron y se tiñeron con el mismo colorante. Como resultado, se reportan por primera vez los números cromosómicos gamético ( $n = x = 19$ ) y somático ( $2n = 2x = 38$ ) de *D. cedrosanum*, y coinciden con observaciones anteriores para otras especies del género *Dasyllirion*, lo cual apunta hacia un nivel de ploidía constante en este grupo. Se observó variación en la morfología y tamaño de los cromosomas somáticos, con tipos de submetacéntrico a subtelocéntrico, y un tamaño que osciló en un rango de 4,43  $\mu\text{m}$ , con una longitud total promedio de 112,38  $\mu\text{m}$  para el complemento cromosómico diploide. Por lo analizado, el complemento cromosómico de *D. cedrosanum* pertenecería a una clasificación 3B de Stebbins, con una variación media entre longitudes cromosómicas y una asimetría intracromosómica baja. Esta variación indica que es factible la construcción de un ideotipo cromosómico para esta especie. El apareamiento cromosómico meiótico mostró características de una herencia disómica propia de una especie diploide, con prevalencia de anillos y cadenas bivalentes, típicamente sin presencia de anomalías en el apareamiento. Las configuraciones

**Abstract.** The genus *Dasyllirion* is a group of plants typically present in the Chihuahuan Desert, perennial, with a dioecious sexual behavior and commonly called sotoles. This genus has been little studied from the biological point of view, and the bases of its reproductive response remain unknown. In this work we studied the chromosome number and meiotic response of *Dasyllirion cedrosanum* in the county of Saltillo, Coahuila, located at the North East of Mexico. For the preparation of mitotic chromosomes, we used a technique based on enzymatic treatment with pectolyase and cellulase, as well as staining with acetocarmine dye. For the study of meiosis, male flower buds were collected, fixed and stained for analysis with the same dye. As a result, the gametic ( $n = x = 19$ ) and somatic chromosome ( $2n = 38$ ) numbers of *D. cedrosanum* are reported for the first time, being consistent with previous findings in other *Dasyllirion* species, which points to a constant ploidy level across the genus. Variation was observed in the morphology and size of the somatic chromosomes, with types ranging from submetacentric to subtelocentric, and sizes oscillating in a range of 4.43  $\mu\text{m}$ , with an average total length of 112.38  $\mu\text{m}$  for the diploid chromosome complement. This shows that the chromosome complement of *D. cedrosanum* would belong to a 3B classification of Stebbins, with a medium variation between chromosome lengths and low chromosome asymmetry. This variation indicates the feasibility of constructing a chromosome ideotype for this species. The meiotic chromosome pairing showed a chromosome behavior consistent with a disomic inheritance characteristic of a diploid species, with prevalence of ring and chain bivalents, typically without pairing abnormalities. Bivalent configurations in all cases were symmetrical.

<sup>1</sup> Estudiante de Postgrado. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Fitomejoramiento, Calzada Antonio Narro 1923, C.P. 25315 Saltillo, Coahuila, México.

<sup>2</sup> Profesor e Investigador. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Fitomejoramiento, Calzada Antonio Narro 1923, C.P. 25315 Saltillo, Coahuila, México.

<sup>3</sup> Técnico Académico. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Fitomejoramiento, Calzada Antonio Narro 1923, C.P. 25315 Saltillo, Coahuila, México.

<sup>4</sup> Profesor e Investigador. Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Boulevard Venustiano Carranza s/n, 25000 Saltillo, Coahuila, México.

Address Correspondence to: M. Humberto Reyes-Valdés, e-mail: MathGenome@gmail.com

Recibido / Received 10.XII.2013. Aceptado / Accepted 12.VII.2014.

bivalentes en todos los casos fueron simétricas. El apareamiento normal y simétrico en meiosis es a su vez indicativo de una producción de gametos balanceados y sugiere la ausencia de una determinación sexual heteromórfica.

**Palabras clave:** *Dasyllirion cedrosanum*; Dioecia; Cromosomas; Mitosis; Meiosis.

The normal and symmetrical meiotic pairing indicates a balanced production of gametes, and suggests the absence of heteromorphic sex determination.

**Keywords:** *Dasyllirion cedrosanum*; Dioecy; Chromosomes; Mitosis; Meiosis.

## INTRODUCCIÓN

El sotol (*Dasyllirion* spp.) es un género de plantas perennes bien representadas en el Desierto Chihuahuense, un área que comprende gran parte del norte de México y sur de los Estados Unidos de América. El producto económicamente más importante del género *Dasyllirion* es la bebida llamada "sotol", obtenida a partir de la fermentación del tallo o cabeza de la planta. Una de las especies de mayor importancia económica dentro del género es *D. cedrosanum*. Se trata de una planta de hojas numerosas que brotan simétricamente desde el tallo, con 30 a 170 cm de longitud, caídas o arqueadas, relativamente amplias, flexibles y en forma de cuchara en el extremo inferior. El tallo es corto, en parte subterráneo, fibroso y robusto, cubierto de hojas persistentes. En muchos casos las hojas muertas que permanecen unidas a la planta y apuntalan a los tallos cortos que tienden a inclinarse con la edad. La raíz es gruesa y carnosa y se extiende desde la base del tallo engrosado. El sotol es una planta dioica; ambos sexos cuentan con una inflorescencia, comúnmente llamada escapo, donde se producen flores con estambres funcionales en las masculinas, o con pistilos funcionales en las femeninas (Bogler, 1994; Cruz-Requena, 2007). Sus flores son pequeñas, con brácteas membranosas y seis sépalos en forma ovoide con márgenes denticulados. En las flores masculinas hay seis estambres, los cuales son rudimentarios en las flores pistiladas o femeninas. En estas últimas, el ovario es súpero, con tres lóculos simples. Aunque la dioecia es una característica que se presenta en muchos grupos taxonómicos de plantas, poco se conoce sobre la base genética de este evento de reciente evolución y, a diferencia de los mamíferos donde los cromosomas sexuales han evolucionado independientemente hasta presentar formas heteromórficas, solo unas pocas especies dioicas de plantas contienen cromosomas sexuales citológicamente distinguibles, como *Silene*, *Rumex* y *Humulus* (Negrutiu et al., 2001; Vyskot y Hobza, 2004; Giraldo et al., 2004).

En cuanto a características citológicas, se reporta un número cromosómico diploide  $2n = 2x = 38$  para *D. wheeleri* y *D. texanum* (Sato, 1935). Sin embargo no se encontraron trabajos con datos cromosómicos sobre *D. cedrosanum* ni sobre el comportamiento meiótico del género. Estos tipos de estudio son muy importantes porque, además de su valor taxonómico, proveen claves importantes sobre la genética de la reproduc-

ción y relaciones evolutivas entre los grupos de plantas. El objetivo de este trabajo fue estudiar el número cromosómico y el comportamiento meiótico de *D. cedrosanum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron plantas de *D. cedrosanum* localizadas en el municipio de Saltillo, Coahuila, una zona con clima templado semiseco (25° 20,947' N-101° 1,669' O, 1588 metros sobre el nivel del mar).

El estudio mitótico se realizó a partir de un total de 250 semillas que fueron recolectadas en cantidades uniformes de cinco plantas elegidas aleatoriamente y ubicadas en la misma localidad. La técnica de preparación de cromosomas mitóticos se basó en el protocolo propuesto por Jewell e Islam-Faridi (1994). La semilla fue esterilizada con hipoclorito de sodio 1% y posteriormente se colocó en papel filtro humedecido dentro de una caja de Petri y se incubó en una cámara de crecimiento a 26 °C hasta obtener meristemos apicales de raíz de 1 cm de tamaño. Los cortes de raíz se realizaron a distintos horarios y se obtuvo el mayor éxito a las 9:30 de la mañana. Los meristemos fueron tratados con 8-hidroxiquinoleína 0,4% para arrestar células en metafase, las cuales se fijaron en una solución de etanol 96° y ácido acético glacial 3:1 v/v. Posteriormente los ápices radiculares se sometieron a hidrólisis con ácido clorhídrico 0,1 N. Se separaron enseguida en un buffer de citrato de sodio, para posteriormente tratarlos bajo incubación con las enzimas pectoliasa y celulasa durante 50 min.

Después del tratamiento los meristemos fueron extendidos en portaobjetos. Los cromosomas fueron teñidos con acetocarmín 1%, y fueron analizados en un microscopio acoplado a un sistema de cómputo con software para análisis de imágenes. El índice centromérico se calculó como la razón entre la longitud del brazo corto y la longitud total del cromosoma. Se calculó el rango de longitudes cromosómicas para cada célula, como la diferencia entre la mayor y la menor. Un índice de asimetría intercromosómica se calculó como uno menos el promedio de los cocientes del brazo largo sobre el brazo corto para cada célula. Por último, se calculó el coeficiente de variación de las longitudes cromosómicas. Estos dos últimos índices son equivalentes a los usados por Romero Zarco (1986) como medidas de asimetría intracromosómica e intercromosómica basadas en cariotipos. Ya que los objetivos del presente trabajo

no incluyeron la construcción de un cariotipo, dichos índices se basaron en mediciones de cromosomas individuales y no en promedios de cromosomas homólogos.

Para el estudio en meiosis, se recolectaron botones florales de 40 plantas de *D. cedrosanum* del sexo masculino. Inmediatamente después de su recolección, el material biológico fue fijado en una solución de etanol a 96° y ácido acético glacial 3:1 v/v, y posteriormente conservado en una misma solución renovada con los mismos componentes.

Los botones florales fueron colocados en porta-objetos donde se aislaron las anteras. Se tiñeron con una gota de carmín 1% en ácido acético 45%, para posteriormente aislar las células y eliminar el tejido de la cubierta y colocar un cubreobjetos. Seguidamente se colocó la preparación en una plancha citológica para su calentamiento durante un minuto y se procedió a su aplastado manual.

Los meiocitos se analizaron en diacinesis. Se pudo apreciar que las preparaciones que se obtuvieron de anteras con un color amarillo claro tenían más probabilidad de contar con esas fases; en cambio si las anteras tenían un color amarillo oscuro, aumentaba la posibilidad de encontrar fases tardías y polen. De las 40 plantas estaminadas en las que se recolectaron botones florales, solamente en 15 se encontraron células en diacinesis. En esta fase se analizaron un total de 78 células.

Se tomaron microfotografías a las células mitóticas y meióticas a través de un microscopio marca Vistavision acoplado con una cámara Pixera DIRactor a un sistema de cómputo que tiene el software Pixera Viewfinder Pro para análisis de imágenes. Para la medición de los cromosomas se utilizó el software AxiomaVision Rel. 4.5, y para el análisis estadístico

de los datos se utilizó el lenguaje y ambiente para cómputo estadístico R (R Development Core Team, 2012).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El 80% de las semillas sembradas para el análisis mitótico mostraron germinación. En 25 células de cinco plantas diferentes se observó consistentemente un número cromosómico  $2n = 38$  (Fig. 1). Este es el número somático de cromosomas ( $2n = 2x = 38$ ) previamente reportado para *Dasyilirion texanum* y *D. wheeleri* (Sato, 1935). Los cromosomas en metafase mitótica revelaron una variación media en morfología y en tamaño dentro de las células, con tipos que variaron de sub-metacéntrico a subtelo-céntrico. De la medición de dos células se estimó una longitud cromosómica promedio de 2,96  $\mu\text{m}$  y un índice centromérico medio de 0,39. En la Tabla 1 se muestran las mediciones ordenadas de menor a mayor de 76 cromosomas de dos células en metafase mitótica, donde se aprecia la variación en tamaños. El rango de longitudes cromosómicas (longitud mayor menos longitud menor) en ambas células fue de 4,43  $\mu\text{m}$ , con un promedio de 2,96  $\mu\text{m}$ . La longitud total promedio por célula de los complementos diploides fue de 112,38  $\mu\text{m}$ , lo cual equivale a una longitud cariopática haploide de 56,19  $\mu\text{m}$ . El índice medio de asimetría cromosómica fue de 0,32 y el coeficiente de variación de lon-

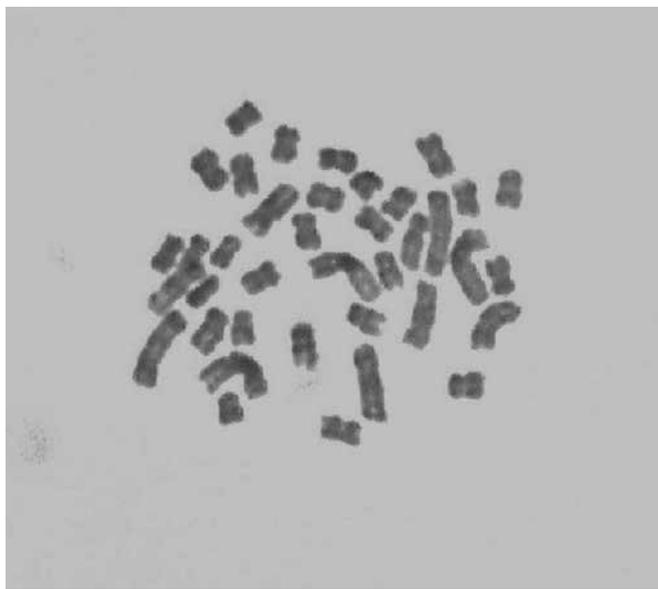


Fig. 1. Microfotografía de una célula en metafase mitótica de *D. cedrosanum*.

Fig. 1. Microphotograph of a mitotic metaphase cell of *D. cedrosanum*.

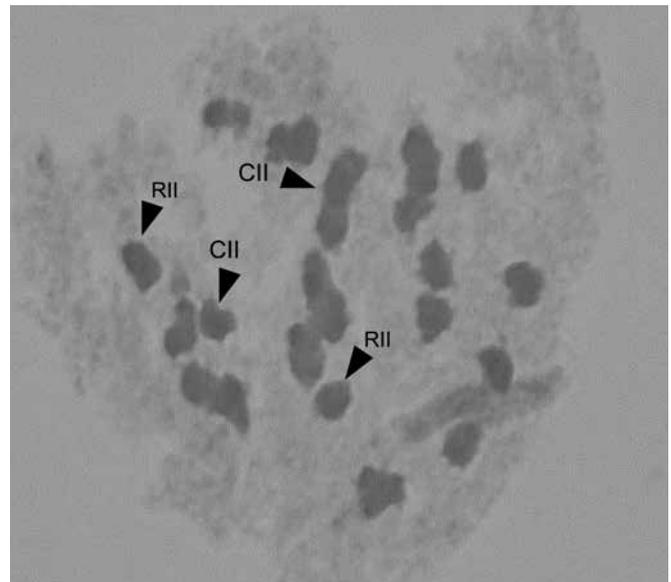


Fig. 2. Microfotografías de una célula meiótica de *D. cedrosanum* en diacinesis con 19 configuraciones compuestas por 15 anillos y 4 cadenas bivalentes. A manera de ejemplo se señalan dos anillos bivalentes (RII) y dos cadenas bivalentes (CII).

Fig. 2. Microphotographs of a *D. cedrosanum* meiotic cell in diakinesis with 19 configurations composed by 15 bivalent rings and 4 bivalent chains. As an example, two bivalent rings (RII) and two bivalent chains (CII) are marked.

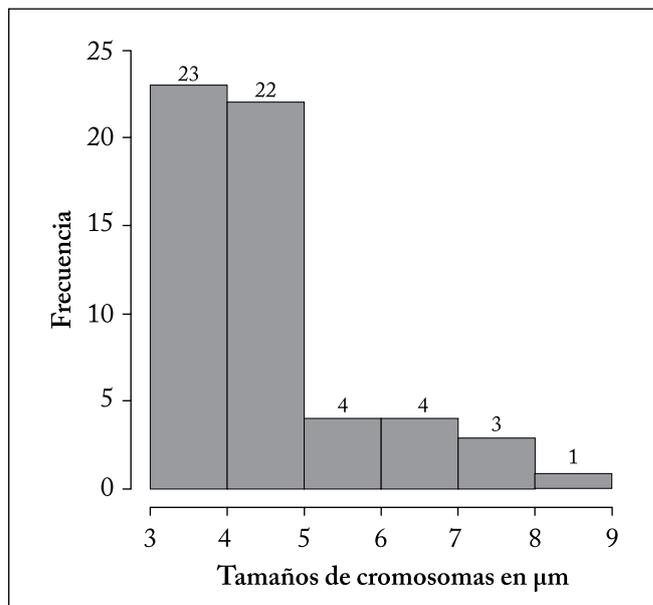
**Tabla 1.** Longitud de los cromosomas (expresada en  $\mu\text{m}$ ) de dos células en metafase mitótica y sus respectivos índices centroméricos.  
**Table 1.** Chromosome lengths (given in  $\mu\text{m}$ ) in two mitotic metaphase cells and their respective centromeric indexes.

Célula I				Célula II			
Longitud	IC	Longitud	IC	Longitud	IC	Longitud	IC
1,45	0,45	2,23	NA	1,50	0,40	2,68	0,41
1,67	0,39	2,24	0,50	2,02	0,47	2,68	0,55
1,75	0,48	2,28	0,49	2,22	0,44	2,71	0,46
1,77	0,48	2,28	0,47	2,24	0,55	2,74	0,41
1,80	0,44	2,29	0,46	2,26	0,50	2,87	0,34
1,83	0,39	2,45	0,35	2,27	0,42	3,03	0,53
1,85	0,41	2,46	0,49	2,37	0,43	3,09	0,23
1,94	0,48	2,52	0,40	2,37	0,50	3,45	0,32
1,98	0,36	2,58	0,36	2,40	0,35	3,82	0,30
1,99	0,36	2,60	0,41	2,48	0,46	4,04	0,30
2,03	0,49	3,06	0,39	2,48	0,50	4,23	0,31
2,06	0,16	3,45	0,31	2,55	0,25	4,69	0,30
2,08	0,39	3,91	0,32	2,55	0,50	4,75	0,17
2,10	0,40	4,02	0,32	2,60	0,59	5,27	0,20
2,14	0,37	4,09	0,40	2,62	0,41	5,28	0,18
2,17	0,41	4,54	0,35	2,62	0,40	5,72	0,27
2,17	0,39	5,10	0,24	2,65	0,43	5,81	0,20
2,21	0,44	5,39	0,32	2,65	0,52	5,88	0,27
2,21	0,46	5,88	0,18	2,67	0,42	5,93	0,36

IC = Índice centromérico. NA = Dato no disponible.

gitudes del 40%. La razón promedio del cromosoma mayor sobre el cromosoma menor por célula fue de 4, con un 28% de cromosomas que mostraron una relación brazo largo/brazo corto mayor que 2:1. Esto sitúa al complemento cromosómico de *D. cedrosanum* en una clasificación 3B de Stebbins (Gunjan y Roy, 2010), con una variación media entre longitudes cromosómicas y una asimetría intracromosómica baja.

El análisis de configuraciones meióticas se hizo solamente en diacinesis, ya que no fue posible en metafase I debido a que los cromosomas tendían a aglutinarse en la placa ecuatorial, haciendo difícil la identificación de los tipos de apareamientos. En las 15 plantas masculinas analizadas se observó una meiosis cuyo comportamiento es el que usualmente se presenta en las especies con herencia disómica. El complemento cromosómico presentó un apareamiento regular con la formación de 19 bivalentes (Fig. 2), igual a la mitad del número somático de cromosomas ( $2n = 2x = 38$ ) observado en mitosis. En la Tabla 2 se presentan los promedios de las configuraciones meióticas observadas como bivalentes, en 78 meiocitos analizados en diacinesis, donde se aprecia una prevalencia de los anillos bivalentes, así como la consistencia en el número de 19 configuraciones.



**Fig. 3.** Histograma de longitudes de cromosomas en diacinesis en *D. cedrosanum*.

**Fig. 3.** Histogram of chromosome lengths in diakinesis in *D. cedrosanum*.

**Tabla 2.** Valores medios de frecuencias de configuraciones en diacinesis de *D. cedrosanum*.**Table 2.** Mean values of configuration frequencies in diakinesis of *D. cedrosanum*.

Planta	Meiocitos analizados	Configuraciones		
		RII	CII	Total
2011-32-1	5	14,60	4,40	19,00
2011-14-4	5	13,40	5,60	19,00
2011-21	10	16,50	2,50	19,00
2011-16-2	5	15,40	3,60	19,00
2011-39-2	5	14,60	4,40	19,00
2011-12-3	4	14,00	5,00	19,00
2011-2	5	14,80	4,20	19,00
2011-172-2	5	16,40	2,60	19,00
2011-8	5	16,00	3,00	19,00
2011-9	5	16,60	2,40	19,00
2011-26	5	15,80	3,20	19,00
2011-17-3	5	13,60	5,40	19,00
2011-15	5	16,80	2,20	19,00
2011-14-3	4	13,25	5,75	19,00
2011-17-1	5	16,60	2,40	19,00
Total	78	15,35	3,65	19,00

RII = anillos bivalentes; CII = cadenas bivalentes.

**Tabla 3.** Resultados de las mediciones de longitud cromosómica realizadas en micras a tres células en diacinesis y sus respectivas medias.**Table 3.** Results of measurements of chromosome lengths in  $\mu\text{m}$  in three diakinesis cells and their respective means.

Célula 1	Célula 2	Célula 3
3,87	4,48	3,47
4,49	4,70	4,59
4,23	4,01	7,00
4,07	4,41	6,49
4,07	3,27	5,65
3,69	7,23	5,04
3,77	7,85	4,17
3,49	4,98	4,14
3,22	7,08	5,04
6,14	3,72	8,90
5,00	4,50	4,11
3,30	3,81	3,18
3,72	3,93	3,62
4,34	3,62	3,93
6,64	3,74	4,16
3,58	3,99	3,49
3,61	4,91	5,26
4,41	3,69	4,20
4,05	3,65	4,32
4,19	4,61	4,78

Sobresale el hecho de que en la muestra aleatoria analizada de células en diacinesis se manifiesta una segregación balanceada, sin presencia de univalentes o multivalentes. Además, todos los apareamientos cromosómicos tuvieron una apariencia simétrica, lo que apunta hacia la ausencia de heteromorfismo cromosómico en la determinación del sexo.

Los cromosomas meióticos presentaron una longitud que osciló entre 3,22  $\mu\text{m}$  y 8,9  $\mu\text{m}$ , con un promedio de 4,52  $\mu\text{m}$ , a partir de mediciones tomadas a tres diferentes células (Tabla 3). Se agruparon las observaciones y se visualizó su distribución con un histograma de frecuencias (Fig. 3). Se observó una alta frecuencia de cromosomas pequeños (3 a 5  $\mu\text{m}$ ), seguida de una menor frecuencia de cromosomas medianos y grandes (mayor de 5  $\mu\text{m}$ ).

## CONCLUSIONES

Los análisis mitóticos y meióticos en *Dasyilirion cedrosanum* revelan un número cromosómico  $2n = 2x = 38$ , el cual es consistente con las observaciones previas en otras dos especies del mismo género. En las células en metafase mitótica se observó una variación media en tamaño y posición del centrómero entre cromosomas, de submetacéntricos a subteloacéntricos, lo que indica la factibilidad de construir un ideotipo cromosómico para la especie. El apareamiento como bivalentes que se observa en las células analizadas indica que es una especie con herencia disómica. La simetría de las configuraciones sugiere la ausencia de un posible heteromorfismo cromosómico en la determinación del sexo.

---

## AGRADECIMIENTOS

---

El presente trabajo fue financiado por el gobierno mexicano a través del proyecto SEP-CONACYT de Investigación Científica Básica clave 154682.

---

## REFERENCIAS

---

- Bogler, D.J. (1994). Taxonomy and phylogeny of *Dasyvirion* (Nolinaceae). PhD. Dissertation. University of Texas. Austin, USA. 583 p.
- Cruz-Requena, M. (2007). Caracterización fisicoquímica de las plantas de diferente sexo del sotol. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia, Michoacán, México.
- Giraldo, C.I., L. Reginfo, E. Aguilar, D. Gaviria y A.H. Alegria (2004). Determinación del sexo en borojo (*Borojoa patinol*, Cuatrecasas) mediante marcadores moleculares. *Revista Colombiana de Biotecnología* 6: 9-14.
- Gunjan, K. y B.K. Roy (2010). Karyotype studies in dominant species of *Aloe* from eastern India. *Caryologia* 63: 41-49.
- Jewell, D.C. y M.N. Islam-Faridi (1994). Details of a technique for somatic chromosome preparation and C-banding of maize. En: Freeling, M. y V. Walbot (eds.), pp. 484-493. The maize handbook. Springer-Verlag. Berlin, Alemania. 759 p.
- Negrutiu, I., B. Vyskot, N. Barbacar, S. Georgiev y F. Moneger (2001). Dioecious plants. A key to the early events of sex chromosome evolution. *Plant Physiology* 127: 1418-1424.
- Romero Zarco, C. (1986). A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 35: 526-530.
- Sato, D. (1935). Analysis of karyotypes in *Yucca*, *Agave* and the related genera with special reference to the phylogenetic significance. *Japanese Journal of Genetics* 11: 272-277.
- R Development Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Vyskot, B. y R. Hobza (2004). Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog. *Trends in Genetics* 20: 432-438.