

**CONSERVACIÓN GENÓMICA DE DOS  
ESPECIES DEL ORDEN ASPARAGALES  
CON CARIOTIPO BIMODAL,  
EMPLEANDO HIBRIDACIÓN GENÓMICA  
*in situ* (GISH)**

**GENOMIC CONSERVATION OF TWO  
SPECIES OF THE ORDER ASPARAGALES  
WITH BIMODAL KARYOTYPE, USING  
GENOMIC *in situ* HYBRIDIZATION (GISH)**

**García Castillo, M.J., L.C. Rodríguez Zapata, L.F. Sánchez Teyer**

CONSERVACIÓN GENÓMICA DE DOS ESPECIES DEL ORDEN ASPARAGALES CON  
CARIOTIPO BIMODAL, EMPLEANDO HIBRIDACIÓN GENÓMICA *in situ* (GISH)  
GENOMIC CONSERVATION OF TWO SPECIES OF THE ORDER ASPARAGALES  
WITH BIMODAL KARYOTYPE, USING GENOMIC *in situ* HYBRIDIZATION (GISH)



## Conservación genómica de dos especies del orden Asparagales con cariotipo bimodal, empleando hibridación genómica *in situ* (GISH)

### Genomic conservation of two species of the order Asparagales with bimodal karyotype, using genomic *in situ* hybridization (GISH)

García Castillo, M.J.,  
L.C. Rodríguez Zapata,  
L.F. Sánchez Teyer

CONSERVACIÓN  
GENÓMICA DE DOS  
ESPECIES DEL ORDEN  
ASPARAGALES CON  
CARIOTIPO BIMODAL,  
EMPLEANDO  
HIBRIDACIÓN GENÓMICA  
*in situ* (GISH)

GENOMIC CONSERVATION  
OF TWO SPECIES OF THE  
ORDER ASPARAGALES  
WITH BIMODAL  
KARYOTYPE, USING  
GENOMIC *in situ*  
HYBRIDIZATION (GISH)

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 60: 367-379. Julio 2025

DOI:  
10.18387/polibotanica.60.22

María José García Castillo <https://orcid.org/MJGC:0000-0001-7595-7809>  
Luis Carlos Rodríguez Zapata <https://orcid.org/LCRZ:0000-0002-4872-8231>  
Lorenzo Felipe Sánchez Teyer / [santey@cicy.mx](mailto:santey@cicy.mx)   
<https://orcid.org/LFST:0000-0002-1714-0240>

*Unidad de Biotecnología. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43  
No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo, CP. 97200, Mérida, Yucatán, México*

**RESUMEN:** El orden Asparagales, una de las principales subdivisiones de las monocotiledóneas, comprende 14 familias y más de 36,000 especies, destacando por su alta tasa de diversificación. Dentro de este orden, se observa una amplia variabilidad en el tamaño del genoma y en el cariotipo, con algunos géneros mostrando un cariotipo bimodal. El género *Aloe*, perteneciente a la familia Asphodelaceae, es notable por su diversidad y aunque la mayoría son diploides, se han identificado también especies tetraploides y hexaploides. A pesar de esta variabilidad en el número de cromosomas, el cariotipo bimodal de *Aloe* se mantiene relativamente estable, con diferencias en el contenido de ADN entre especies. En contraste, el género *Agave* de la familia Asparagaceae, presenta un cariotipo bimodal conservado con 30 cromosomas en el genoma haploide, que incluye 5 cromosomas grandes y 25 pequeños. Las especies de *Agave* muestran variaciones naturales en ploidía, pero el patrón básico del cariotipo se conserva. La filogenia basada en genomas completos sugiere que *Agave* está estrechamente relacionado con otros géneros como *Manfreda* y *Polianthes*. La investigación sobre la hibridación *in situ* y la técnica GISH ha permitido identificar y analizar reordenamientos genómicos y componentes de cariotipos en diversas especies. En este contexto, se ha llevado a cabo un estudio para hibridar el genoma de *Aloe vera* en núcleos en interfase y células en metafase de *Agave* híbrido H11648 para evaluar cómo un género evolutivamente distanciado se integra en el genoma del *Agave*, buscando entender mejor las dinámicas de cariotipo en estas plantas. Nuestros resultados mostraron conservación de regiones genómicas de *Aloe* en *Agave* al observarse hibridación genómica en todos los cromosomas y en núcleos en interfase de *Agave* híbrido H11648. Estos datos fuertemente sugieren que el cariotipo bimodal de agaves no fue adquirido por la fusión de genomas con diferentes tamaños de cromosomas, sino más bien por rearreglos, fusiones y fisiones durante el período de evolución del género. **Palabras clave:** *Agave*, *Aloe*, GISH, Cariotipo bimodal.

**ABSTRACT:** The Asparagales order, one of the main subdivisions of the monocots, comprises 14 families and more than 36,000 species, notable for its high rate of diversification. Within this order, a wide variability in genome size and karyotype is observed, with some genera showing a bimodal karyotype. The genus *Aloe*, belonging to the family Asphodelaceae, is notable for its diversity and although most are diploid, tetraploid and hexaploid species have also been identified. Despite this variability in chromosome number, *Aloe*'s bimodal karyotype remains relatively stable, with differences in DNA content between species. In contrast, the *Agave* genus of the Asparagaceae family, presents a conserved bimodal karyotype with 30 chromosomes in the haploid genome, which includes 5 large chromosomes and 25 small chromosomes. *Agave* species show natural variations in ploidy, but the basic karyotype pattern is

preserved. Phylogeny based on whole genomes suggests that *Agave* is closely related to other genera such as *Manfreda* and *Polianthes*. Research on *in situ* hybridization and the GISH technique has made it possible to identify and analyze genomic rearrangements and karyotype components in various species. In this context, a study has been carried out to hybridize the genome of *Aloe vera* in interphase nuclei and metaphase cells of hybrid *Agave* H11648 to evaluate how an evolutionarily distanced genus integrates into the *Agave* genome, seeking to better understand the karyotype dynamics in these plants. Our results showed preservation of genomic regions of *Aloe* in *Agave* by observing genomic hybridization in all chromosomes and in interface nuclei in hybrid *Agave* H11648. These data strongly suggest that the bimodal karyotype of agaves was not acquired by the fusion of genomes with different chromosome sizes, but rather by rearrangements, fusions, and fissions during the period of evolution of the genus.

**Key words:** *Agave*, *Aloe*, GISH, Bimodal Karyotype

## INTRODUCCIÓN

El orden Asparagales, dentro de las monocotiledoneas, incluye 14 familias (Amaryllidaceae, Asparagaceae, Asphodelaceae, Asteliaceae, Blandfordiaceae, Boryaceae, Doryanthaceae, Hypoxidaceae, Iridaceae, Ixioliriaceae, Lanariaceae, Orchidaceae, Tecophilaeaceae y Xeronemataceae), 1122 géneros y más de 36,000 especies (APG). Este orden representa la mayor tasa de diversificación de las monocotiledóneas (Magallón and Castillo 2009), con una edad estimada del grupo corona de aproximadamente 125.3 millones de años (Tank *et al.*, 2015) y una gran diversidad en tamaños de genoma desde 0,3 -82,2 pg (Leitch and Leitch 2013). En este orden existen reportes de diversos géneros que presentan un cariotipo bimodal como *Aloe*, *Agave*, *Camasia*, *Yucca*, *Chologalum*, *Hastingsiana*, *Hesperocallis*, entre otros (Halpin and Fishbein 2013; Robert *et al.*, 2008; McKain *et al.*, 2016).

*Aloe* L. pertenece a la familia Asphodelaceae que contiene alrededor de 940 especies y una edad aproximada de 45 a 63 millones de años. *Aloe* L. es conocida como una Lili del desierto, con gran aplicación como planta medicinal (Carter and Royal Botanic Gardens 1994), de la cual se conocen alrededor de 500 especies distribuidas alrededor del mundo, principalmente en zonas tropicales (Carter and Royal Botanic Gardens 1994; Gunjan and Roy 2010). El género presenta una gran diversidad en tamaño y morfología desde árboles que crecen 15 m de altura hasta pequeñas plantas con una roseta de 30 mm y aunque en su mayoría son diploides ( $2n=14$ ), se han identificado algunas especies tetraploides y una especie hexaploide (Brandham and Doherty 1998).

Las especies analizadas del género *Aloe* L. en general muestran una estabilidad en el cariotipo bimodal con una estructura básica haploide de un cromosoma grande, submetacéntrico (un brazo del cromosoma es ligeramente mayor que otro), tres cromosomas grandes acrocéntricos (se refiere a cromosomas con el centrómero cercano a un extremo) y tres cromosomas pequeños acrocéntricos (Brandham and Doherty 1998), sin embargo existen reportes de asimetría cariotípica en algunas especies del género (Gunjan and Roy 2010). En contraste con la uniformidad de la estructura básica cromosómica, este género presenta una gran variación en el contenido de ADN 1C desde 10.5 pg en *A. tenuori* hasta 23.9 pg en *A. peckii*, (Brandham and Doherty 1998).

Al evaluar la distribución de la posición de los loci 5S y 45S en 13 especies de *Aloe*, se evidenció una conservación en localización intersticial en cromosomas grandes para 5S, en comparación con diferencias en el número, localización y tamaño de loci encontrado entre las especies analizadas en 45S (Adams *et al.*, 2000) posiblemente originados durante la especiación de *Aloe*. Por su parte, los agaves, pertenece a la familia Asparagaceae que incluye aproximadamente 2900 especies distribuidas alrededor del mundo y se estima que la divergencia del grupo corona comenzó hace unos 89 millones de años (Eguiarte 1994).

El género *Agave* L. es un género joven dentro de Asparagales con una edad estimada entre 7.8 y 10.1 millones que incluye más de 290 especies Good-Avila *et al.* (2006), todas ellas con cariotipo bimodal conservado de 30 cromosomas en genoma haploide que consiste en 5 cromosomas grandes y 25 cromosomas pequeños. En este género se aprecia una serie de ploidías naturales desde diploides hasta octoploides, con una conservación en los sitios y distribución de las

regiones 5S y 45S, independientemente del nivel de ploidía y un incremento proporcional del contenido de ADN con relación al nivel de ploidía (Robert *et al.*, 2008).

El *Agave* híbrido H11648 fue desarrollado en Tanzania a principios del siglo pasado, originado de la cruce de las especies *A. angustifolia* x *A. amaniensis* y retrocruzado con *A. amaniensis*. Es un híbrido con gran capacidad para generar fibra larga con un alto rendimiento, por lo que ha sido la base productiva de fibra natural en Tanzania y el único híbrido comercial de agaves.

El clado agavoide descrito por Bogler and Simpson (1996) incluye 15 géneros y 10 de ellos presentan un cariotipo bimodal constante de 5 cromosomas grandes y 25 cromosomas pequeños mientras que los 5 géneros restantes muestran números variables de cromosomas grandes y pequeños. A este grupo se le denominó como ABK (Agavoid Bimodal Karyotype), por sus siglas en inglés (McKain *et al.*, 2012).

En diversas referencias se propone la hipótesis de que el cariotipo bimodal en *Agave* se establece como la integración de dos genomas ancestrales, con diversos eventos posteriores de rearrreglos internos, duplicaciones, poliploidía y diversos cambios evolutivos (Ramos *et al.*, 2023; McKain *et al.*, 2012). Por su parte, la filogenia basada en genomas completos de cloroplasto agrupa a los géneros *Agave*, *Manfreda*, *Polianthes* y *Bescomnia*, dentro del clado ABK de cloroplasto, sugiriendo diversidad evolutiva con relación a otros géneros de cariotipo bimodal (McKain *et al.*, 2016).

La hibridación *in situ* (ISH) ha sido una herramienta clave para identificar rearrreglos, inserciones, patrones de distribución y número de sitios de hibridación, así como componentes parentales de cariotipos en diversas especies como fresa, trigo, cebada, algodón, entre otros (Humphreys *et al.*, 1995; Rey *et al.*, 2018; Yu-xiang *et al.*, 2013). En particular, la hibridación genómica *in situ* (GISH) se ha empleado ampliamente para la identificación de componentes genómicos tanto en híbridos como en alopoliploides como *Nicotiana tabacum* (Shibata *et al.*, 2013).

Derivado de lo anterior, en esta investigación hibridamos el genoma de *Aloe vera* en las células en interfase y cromosomas en metafase de *Agave* híbrido H11648 con el objetivo de determinar la representatividad de *Aloe vera*, especie con cariotipo bimodal y alejada evolutivamente por varios millones de años, en el genoma del *Agave*, empleando GISH.

## MÉTODOS

### Preparación de células en interfase

La colecta de raíces se realizó de plantas de *A.* híbrido H11648 mantenidas en maceta. Los cromosomas en metafase se obtuvieron a partir de ápices de la raíz incubados en una solución saturada de paradiclorobenceno (PDB) durante 3 horas a temperatura ambiente y posteriormente fijadas en una solución de alcohol absoluto y ácido acético glacial (3:1) durante 24 horas.

Las puntas de raíz fueron incubadas con viscozima (SIGMA cat. V2010) a 37°C por 25 minutos y posteriormente, se realizaron dos lavados con agua. Bajo estereoscopio se retiró la cofia de la raíz y se preparó una suspensión celular con ácido acético al 60% y se colocaron 10 ml de la suspensión celular en el portaobjetos y se colocó un cubreobjetos para realizar la homogenización mediante "squash". El análisis de preparaciones se realizó en un microscopio de contraste de fases. A las preparaciones que presentaban cromosomas en metafase y núcleos en interfase, se les retiró el cubreobjetos para su uso en la técnica de GISH.

### Marcaje de la sonda

Por su parte el marcaje de ADN genómico de *Aloe* se realizó por Nick Translation para la incorporación de DIG-11dUTP empleando el kit para marcaje con digoxigenina 'DIG DNA Labeling Kit', (Roche™). La incorporación se verificó mediante dot-blot de acuerdo con lo reportado por Robert *et al.*, (2008).

### GISH de ADN genómico de Aloe

Las preparaciones seleccionadas que contenían núcleos en interfase y cromosomas en metafase de *Agave* híbrido fueron tratadas con 100 µg/ml de RNasa A, incubando durante 1 hora a 37°C con dos lavados posteriores con 2X SSC, durante 5 min. Transcurrido el tiempo, las preparaciones se incubaron en 10 mM de HCL por 5 min y posteriormente se incubaron con pepsina (10 µl/ml)

(SIGMA cat. P6887) a 37 °C por 15 min. Posteriormente fueron lavadas dos veces en 2X SSC por 5 min. Se fijaron en paraformaldehído 4% (p/v) (SIGMA cat. P6148), durante 10 min. Transcurrido el tiempo las preparaciones se lavaron dos veces en 2X SSC por 5 min y se deshidrataron con etanol a diferentes concentraciones 70%, 90% y 96%, por 3 min cada una, secando a temperatura ambiente. La desnaturalización de éstas se realizó incubando 2 minutos con 70% de formamida (v/v) (SIGMA cat. F5786) a 75°C. Inmediatamente a la desnaturalización, fueron deshidratadas en etanol al 70%, 90% y 96%, en hielo durante 5 min en cada paso.

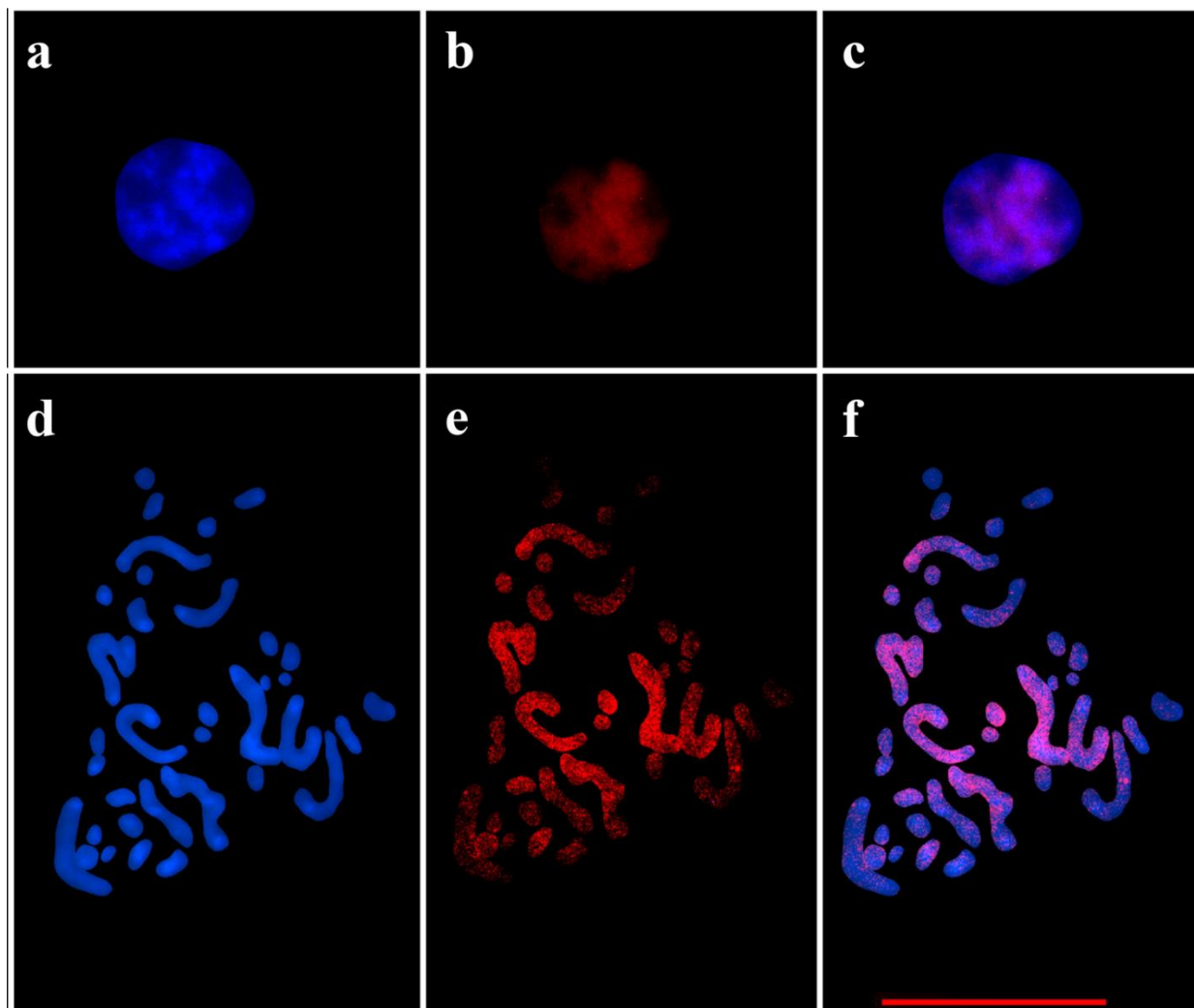
A cada preparación se le aplicaron 40µl de la mezcla de hibridación compuesta de formamida 50% (v/v) (SIGMA cat. F5786), 2X SSC, 10% de Sulfato de Dextrano (p/v) (SIGMA cat. D8906), 0.17% de SDS y 100 ng del ADN genómico de *Aloe* con marcaje) previamente desnaturalizada a 75 °C durante 10 min y mantenida en hielo hasta su aplicación. Las preparaciones con la mezcla de hibridación se incubaron a 42 °C en cámara húmeda durante toda la noche. Posterior a la hibridación, se procedió a la detección de la sonda en donde las preparaciones fueron lavadas dos veces en 2X SSC por 5 min. Después de los lavados fueron colocadas por 5 min (una preparación a la vez) en una serie de 20% de formamida (v/v) y 2X SSC atemperadas a 42 °C a baño húmedo. Enseguida, las preparaciones se lavaron dos veces en 4X SSC y 0.2% (v/v) de tween 20 (SIGMA cat. P1379) durante 5 min.

Transcurrido el tiempo de lavados astringentes, a las preparaciones se les adicionó BSA 5% (p/v) (SIGMA cat. A2153) y se incubaron a 37 °C durante 20 min para posteriormente aplicar 5 µl (0.75U/µl) de estreptavidina acoplada con CY3 para la detección del ADN genómico de *Aloe vera*, y se incubó a 37°C durante una hora. Pasado el tiempo de detección, las preparaciones se lavaron dos veces en 4x SSC y 0.2% de tween 20 (v/v) (SIGMA cat. P1379). Las preparaciones se escurrieron y se aplicaron 30 µl (1.5 µg/ml) del medio de montaje Vectashield con DAPI (VECTOR cat. H-1200), un cubreobjetos fue colocado sobre la preparación y por último se mantuvo en oscuridad por 10 min. Las preparaciones fueron analizadas en un microscopio de epifluorescencia Carl Zeiss Axioplan y las imágenes se capturan mediante una cámara AxioCam MRm y el software AxioVision de Carl Zeiss.

Las imágenes fueron procesadas en los parámetros de curvas de nivel, brillo y contraste en el programa Photoshop versión 25.3.1.

## RESULTADOS

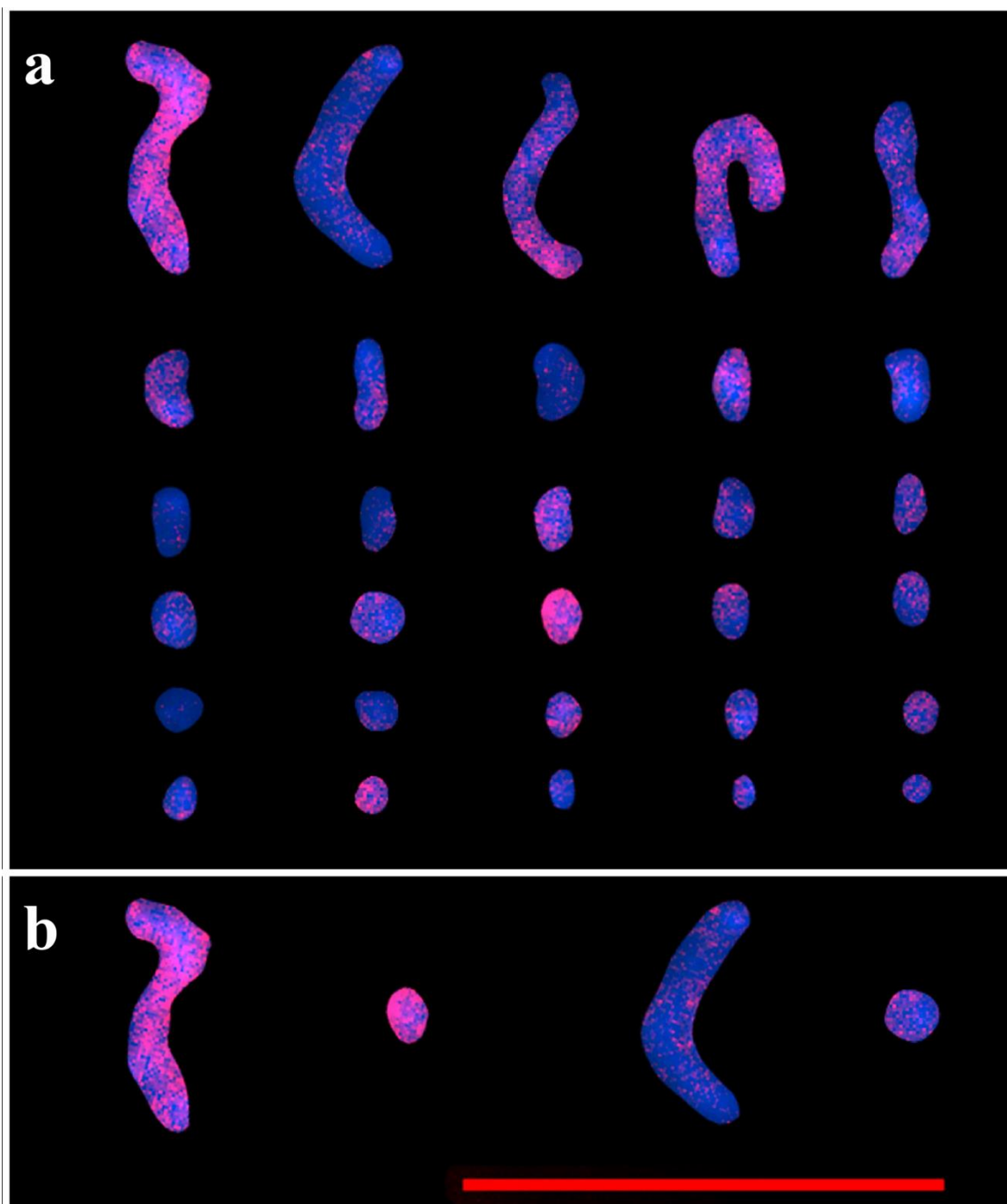
En este trabajo, a partir de puntas de raíz colectadas a primeras horas de la mañana se obtuvieron tanto núcleos en interfase como cromosomas en metafase de *Agave* híbrido H11648 y en los cuales se analizó, mediante GISH el perfil de hibridación del genoma *Aloe*.



**Figura 1.** Hibridación genómica *in situ* de *Aloe vera* en *Agave* híbrido H11648. Paneles (a-c) hibridación genómica en células en interfase de *Agave* híbrido H11648 teñidas con DAPI (a), genoma de *Aloe vera* marcado con Cy3-rhodamina (b) e imágenes acopladas (c). Los paneles (d-f) muestran la hibridación genómica *in situ* de *Aloe vera* en cromosomas en metafase de *Agave* híbrido H11648: DAPI(d), genoma de *Aloe*-Cy3 (e), imágenes acopladas (f). La barra de escala representa 10 mm.

**Figure 1.** *In situ* genomic hybridization of *Aloe vera* on *Agave* hybrid H11648. Panels (a-c) genomic hybridization in interphase cells of *Agave* hybrid H11648 stained with DAPI (a), *Aloe vera* genome labeled with Cy3-rhodamine (b), and flattened images (c). Panels (d-f) show *in situ* genomic hybridization of *Aloe vera* on metaphase chromosomes of *Agave* hybrid H11648: DAPI (d), *Aloe*-Cy3 genome (e), flattened images (f). Scale bar represents 10 mm.

Para determinar la representatividad del genoma de otra especie con cariotipo bimodal en el genoma de agaves, se realizó la hibridación genómica *in situ* de *Aloe* tanto en núcleos en interfase (Figura 1 panel a-c), como en cromosomas en metafase (Figura 1 panel d-f) de *Agave* híbrido H11648. A partir de la localización genómica de *Aloe* se observó una hibridación (señales en color rojo) de éste en todas las regiones del genoma de *Agave* híbrido, observando una cobertura casi completa, aunque con ligeras diferencias en intensidad para algunas pequeñas regiones del genoma de *Agave* descondensado, en interfase (Figura 1c). Por su parte en cromosomas en metafase se aprecian sitios de hibridación (señales en rojo) a lo largo de los cromosomas tanto en el componente de cromosomas pequeños, como en el componente de cromosomas grandes, pero con hibridación en todos los cromosomas (Figura 1f) aunque con cobertura diferencial.



**Figura 2.** Perfil de hibridación genómica *in situ* del genoma de *Aloe vera* en el componente bimodal de *Agave* híbrido H11648. a) cromosomas en metafase de *Agave* teñidos con DAPI (azul) con hibridación genómica de *Aloe vera* marcado con Cy3 (Rosado). b) Comparativo de cobertura en cromosomas contrastantes seleccionados con relación al perfil de hibridación del genoma de *Aloe vera*. La barra de escala representa 10 mm.

**Figure 2.** *In situ* genomic hybridization profile of the *Aloe vera* genome in the bimodal component of hybrid *Agave* H11648. a) DAPI-stained *Agave* metaphase chromosomes (blue) with Cy3-labeled *Aloe vera* genomic hybridization (pink). b) Comparison of coverage on selected contrasting chromosomes with respect to the hybridization profile of the *Aloe vera* genome. The scale bar represents 10 mm.

El perfil específico de hibridación se presenta en una muestra de los cromosomas, seleccionando 5 grandes y 25 pequeños (Figura 2a), se observó perfiles de hibridación en los 30 cromosomas. En los cromosomas grandes se observó cobertura casi completa a lo largo de cada cromosoma, aunque con menor incidencia en las regiones teloméricas, en 3 de los 5 cromosomas y parcial en los dos restantes, mientras que en de los 25 cromosomas pequeños se observó una cobertura casi completa en 12 de ellos y parcial en los 13 cromosomas restantes.

La comparación de cobertura del genoma de *Aloe vera* en cromosomas de *Agave* híbrido H11648, de manera contrastante se presenta en la figura 2b, en la cual se comparan dos cromosomas grandes y dos pequeños con perfiles de hibridación diferencial, mientras que en uno grande y uno pequeño la cobertura es cercana al 90% del cromosoma total, el otro es cercano al 10%. El patrón de hibridación se aprecia distribuido a lo largo de los cromosomas, sin un perfil de hibridación específico aparente.

La presencia de hibridación en cromosomas en metafase o núcleos en interfase, evidencia de manera global la conservación de regiones comunes a ambos genomas, ello a pesar de la diferencia evolutiva de varios millones de años.

En otras especies, empleando GISH se ha podido identificar la parte del componente genómico de especies parentales donde claramente uno de los parentales hibrida en una parte de los cromosomas en metafase (Lee *et al.*, 2016). El perfil de hibridación observado en el presente trabajo, sugiere una gran conservación de los genomas evaluados y aporta evidencia que descarta, al menos parcialmente, la hipótesis de la hibridación de genomas como origen del cariotipo bimodal en agaves.

## DISCUSIÓN

Mientras que las diferencias en el tamaño del genoma pueden surgir de duplicaciones o deleción de ADN redundante o de la duplicación del genoma completo, hay casos de una forma especial de asimetría caracterizada por la presencia de dos conjuntos distintos de cromosomas de tamaño contrastante en un complemento cromosómico, es decir, un "cariotipo bimodal". Tales cariotipos bimodales pueden originarse ya sea por fusión que resulta en la formación de un gran conjunto de cromosomas a partir de diversos cromosomas pequeños o regiones de cromosomas específicos o por fisión que resulta del fraccionamiento de un cromosoma en nuevos cromosomas más pequeños o acumulación diferencial de cromosomas, secuencias repetitivas o por combinaciones aloploidoides de especies con diferentes tamaños cromosómicos (Baez *et al.*, 2019). Los cariotipos bimodales son comunes en familias de monocotiledóneas como Asphodelaceae (*Aloe*, *Haworthia* y *Gasteria*) y Agavaceae (*Agave*, *Yucca* y *Camassia*) (Weiss-Schneeweiss and Schneeweiss 2013).

Los resultados obtenidos en este trabajo con relación a la representatividad del genoma de *Aloe* en el genoma de *Agave*, tanto en cromosomas grandes como pequeños sugiere, de manera preliminar que el cariotipo bimodal no se obtuvo por la integración de dos genomas, tal como se ha reportado para los cariotipos bimodales de especies de espárragos, donde se plantea la hipótesis de un reordenamiento cromosómico que involucra eventos de fusión-fisión (Schubert and Lysak 2011).

El orden Asparagales, que incluye 14 familias tiene una edad estimada del grupo corona de aproximadamente 125.3 millones de años (Tank *et al.*, 2015) y una gran diversidad en tamaños de genoma en valor C que varían entre 0,3 y 82,2 pg (Leitch and Leitch 2013). El género *Aloe L.* pertenece a la familia Asphodelaceae que contiene alrededor de 940 especies y una edad aproximada de 45 a 63 millones de años y presenta una gran diversidad en tamaño y morfología de planta, aunque en su mayoría son diploides se ( $2n=2x=14$ ). Sus especies muestran en general estabilidad en el cariotipo bimodal con una estructura básica haploide de un cromosoma grande, submetacéntrico tres cromosomas grandes acrocéntricos y tres cromosomas pequeños acrocéntricos (Brandham and Doherty 1998). El contenido de ADN reportado en valor C es cercano a los 20 pg por genoma haploide (Steele *et al.*, 2012), pero existen reportes de asimetría cariotípica en algunas especies del género (Gunjan and Roy, 2010). En el estudio reportado por

Jahan y colaboradores en (2014), se establece que los cromosomas de *Aloe vera* mostraron una longitud promedio de una población analizada en Pakistán que varió de 2.36 hasta 7.95  $\mu\text{m}$ .

Por su parte, el género *Agave*, de acuerdo a lo reportado por (Good-Avila *et al.*, 2006), es un género joven dentro de Asparagales con una edad estimada entre 7.8 y 10.1 millones de años con una constancia en su tamaño de genoma en valor C cercano a 4.2 pg de ADN por genoma haploide, que incrementa de manera casi proporcional con el nivel de ploidía (Gomez-Rodriguez *et al.*, 2013; Robert *et al.*, 2008) y todas sus especies presentan el cariotipo bimodal típico con número básico de 30 cromosomas, de los cuales 5 cromosomas son grandes y 25 cromosomas son pequeños (Castorena-Sánchez *et al.*, 1991; Robert *et al.*, 2008). Este género presenta una serie de ploidía desde diploide hasta octoploide manteniendo siempre la proporción del número básico y del cariotipo bimodal.

El perfil de hibridación presentado aquí muestra que el genoma de *Aloe*, una especie ancestral, está presente en los cromosomas de *Agave* tanto en el componente de cromosomas grandes como en los pequeños, observando algunos con hibridación casi completa de los cromosomas, a pesar de la distancia evolutiva de ambas familias. Este hecho es relevante y sugiere un mecanismo de conservación de una gran cantidad de información genética a lo largo de la evolución de ambas especies, lo cual contrasta con las diferencias observadas entre las especies de *Agave* y de *Aloe* al evaluar mediante hibridación fluorescente *in situ* la distribución de la región 5S y 45S en 13 especies de *Aloe*, se evidenció una conservación en localización intersticial en cromosomas grandes de la región 5S, en comparación con diferencias en el número, localización y tamaño de loci encontrado entre las especies analizadas en la región 45S (Adams *et al.*, 2000), posiblemente originados durante la especiación de *Aloe*. En contraste, a lo observado en *Agave* muestra que cada genoma haploide presenta un sitio 18S en cromosoma grande y un sitio 5S en cromosoma pequeño y su número aumenta de manera proporcional con el nivel de ploidía, en todas las especies de *Agave* analizadas (Robert *et al.*, 2008; Gomez-Rodriguez *et al.*, 2013).

Los géneros de *Agave* y *Aloe* están evolutivamente alejados con una divergencia superior a 27 millones de años (Bogler and Simpson 1996; Steele *et al.*, 2012), por lo cual es de suma importancia lo observado en el presente trabajo, toda vez que el perfil de hibridación del genoma de *Aloe* en el de *Agave* híbrido muestra presencia de sitios distribuidos a lo largo del genoma de *Agave*, sugiriendo conservación de regiones genómicas conservadas presentes en especies ancestrales anteriores a la divergencia evolutiva de éstas.

La divergencia estimada en géneros relacionadas a los agaves como *Yucca* se estimó en 20 millones de años, mientras que con *Camassia* o *Hesperaloe* se estimó en 25 millones de años y con *Hosta* en aproximadamente 27 millones de años (McKain *et al.*, 2016) y todas ellas presentan un cariotipo bimodal. Basado en análisis de filogenia, se ha reportado que *Aloe vera* compartió el ancestro reciente más común con las especies de Poales y Zingiberales, también dentro del orden Asparagales; siendo más cercano a los otros géneros suculentos como *Haworthia*, *Gasteria* y *Astroloba* (Chase *et al.*, 2016; Qian and Jin 2016) que con los agaves.

Lee *et al.* (2016) demostraron mediante GISH en un híbrido de *Aloe* con cariotipo bimodal, que la especie *A. arborescens* es el donador del genoma materno y el complemento proviene de *A. vera*, lo cual se observó mediante el patrón de hibridación genómica en solamente algunos de los cromosomas del cariotipo. En contraste con este reporte, nuestros resultados mostraron presencia del componente genómico de *Aloe vera* en todos los cromosomas de *Agave* híbrido a lo largo del cariotipo bimodal.

Se ha reportado en angiospermas, que la hibridación ancestral es una fuerza evolutiva importante que desempeña un papel destacado en los mecanismos de especiación (Stull *et al.*, 2023). Por su parte la diversidad cromosómica puede surgir de alteraciones a través de translocaciones intragenómicas, inversiones pericéntricas y fusión/fisión, que pueden afectar o no el tamaño del genoma (Vimala *et al.*, 2021). La diferencia en el tamaño del genoma haploide entre *Agave* (4.2 pg) y *Aloe* (19 pg) es de casi 4 veces, posiblemente derivado de la contribución de las regiones repetidas como satélites y retroelementos que provocan el incremento del genoma.

El mayor impacto en la variación del tamaño del genoma en las plantas, así como en todos los eucariotas, parece haber sido la amplificación/eliminación de secuencias repetitivas, especialmente elementos móviles (Wang *et al.*, 2021a). El número de secuencias repetitivas difiere significativamente entre las especies, y el contenido promedio de secuencias repetitivas en las plantas oscila entre el 14% y el 90%. La mayoría (más del 75%) de este contenido repetitivo

se identificó como elementos móviles (Elliott and Gregory, 2015; Vondrak *et al.*, 2020). Se ha reportado que las regiones repetidas en especies como *Allium* (Pearce *et al.*, 1996) y *Agave* (Ramos *et al.*, 2023), *Zea* (Sharma and Presting, 2008), entre otros, puede rondar del 60 al 90% del genoma total. Como complemento a este trabajo sería importante el aislamiento de familias de retroelementos presentes en especies ancestrales para determinar su contribución al tamaño del genoma de los agaves.

GISH ha sido ampliamente utilizado para determinar el componente ancestral/parentales de híbridos o especies alopoliploides (Markova and Vyskot, 2009), como *Arabidopsis* (Ali *et al.*, 2004), *Brassica* (Hasterok *et al.*, 2005), *Trifolium* (Ullah *et al.*, 2022), *Coffea* (Herrera *et al.*, 2012), *Gossypium* (Wu *et al.*, 2013), *Nicotiana* (Shibata *et al.*, 2013), *Tragopogon* (Chester *et al.*, 2015), y *Triticum* (Wang *et al.*, 2021b), entre otros. La diferenciación exitosa de los subgenomas en los cromosomas y los núcleos de interfase de los poliploides a través de GISH depende en gran medida de la presencia de secuencias repetitivas específicas del genoma (Kato *et al.*, 2005).

## CONCLUSIONES

La presencia y cobertura de hibridación del ADN de una especie ancestral como *Aloe vera* en cromosomas en metafase o núcleos en interfase de agave, evidencia de manera global la conservación de regiones comunes a ambos genomas, descartando la teoría de la hibridación genómica como origen del cariotipo bimodal. Lo anterior es relevante ya que el género *Agave* L. es un género joven dentro de asparagales con una edad estimada entre 7.8 y 10.1 millones que incluye más de 290 especies (Good-Avila *et al.*, 2006), todas ellas con cariotipo bimodal conservado de 30 cromosomas en genoma haploide que consiste en 5 cromosomas grandes y 25 cromosomas pequeños. Por su parte *Aloe* L. pertenece a la familia asphodelaceae que contiene alrededor de 940 especies y una edad aproximada de 45 a 63 millones de años y hasta el momento se desconoce el origen del cariotipo bimodal en los agaves. La información generada en esta investigación de manera directa sugiere que el cariotipo bimodal en agaves puede ser originado por fusiones y fisiones más que por alopoliploidía de especies ancestrales. Hasta nuestro conocimiento, este es el primer reporte empleando GISH para estudiar el origen del cariotipo bimodal en agaves.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONAHCYT por la beca postdoctoral de MJGC CVU 591024 y por el proyecto CF-2023-1-1877; agradecen además al IQ Felipe Barredo Pool por el apoyo técnico brindado en microscopía de epifluorescencia.

## LITERATURA CITADA

- Adams, S.P., I.J. Leitch, M.D. Bennet, M.W. Chase, A.R. Leitch. (2000). Ribosomal DNA evolution and phylogeny in *Aloe* (Asphodelaceae). *Am J Bot* 87 (11):1578-1583. <https://doi.org/10.2307/2656733>
- Ali, H.B.M., M.A. Lysak, I. Schubert. (2004). Genomic *in situ* hybridization in plants with small genomes is feasible and elucidates the chromosomal parentage in interspecific *Arabidopsis* hybrids. *Genome* 47 (5):954-960. <https://doi.org/10.1139/g04-041>
- Baez, M., M. Vaio, S. Dreissig, V. Schubert, A. Houben, A. Pedrosa-Harand. (2019). Together But Different: The Subgenomes of the Bimodal Eleutherine Karyotypes Are Differentially Organized. *Front Plant Sci* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01170>
- Bogler, D.J., B.B. Simpson. (1996). Phylogeny of Agavaceae based on ITS rDNA sequence variation. *Am J Bot* 83 (9):1225-1235. <https://doi.org/10.2307/2446206>

- Brandham, P.E., M.J. Doherty. (1998). Genome size variation in the Aloaceae, an angiosperm family displaying karyotypic orthoselection. *Ann Bot-London* 82:67-73. <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0742>
- Carter, S. (1994). *Flora of Tropical East Africa - Aloaceae* (1994). Royal Botanic Gardens K. Taylor & Francis.
- Castorena-Sánchez, I., R.M. Escobedo, A. Quiroz. (1991). New cytotaxonomical determinants recognized in six taxa of *Agave* in the sections Rigidae and Sisalanae. *Canadian Journal of Botany* 69 (6):1257-1264. <https://doi.org/10.1139/b91-163>
- Chase, M.W., M. Christenhusz, M. Fay, J. Byng, W.S. Judd, D. Soltis, D. Mabberley, A. Sennikov, P.S. Soltis, P.F. Stevens. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical journal of the Linnean Society* 181 (1):1-20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- Chester, M., R.K. Riley, P.S. Soltis, D.E. Soltis. (2015) Patterns of chromosomal variation in natural populations of the neoallotetraploid *Tragopogon mirus* (Asteraceae). *Heredity* 114 (3):309-317. <https://doi.org/10.1038/hdy.2014.101>
- Eguiarte, L.E., M.R. Duvall, G.H. Learn Jr., and M.T. Clegg. (1994) The systematic status of the Agavaceae and Nolinaceae and related Asparagales in the Monocotyledons: An analysis based on the rbcL gene sequence. *Botanical Sciences* (54): 35-56. <https://doi.org/10.17129/botsoci.1427>
- Elliott, T.A., T.R. Gregory. (2015) What's in a genome? The C-value enigma and the evolution of eukaryotic genome content. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370 (1678):20140331. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0331>
- Gomez-Rodriguez, V.M., B. Rodriguez-Garay, G. Palomino, J. Martinez, R. Barba-Gonzalez. (2013). Physical mapping of 5S and 18S ribosomal DNA in three species of *Agave* (Asparagales, Asparagaceae). *Comp Cytogenet* 7 (3):191-203. doi:10.3897/CompCytogen.v7i3.5337
- Good-Avila, S.V., V. Souza, B.S. Gaut, L.E. Eguiarte. (2006). Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (24):9124-9129. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603312103>
- Gunjan, K., B.K. Roy. (2010). Karyotype studies in dominant species of *Aloe* from eastern India. *Caryologia* 63 (1):41-49. <https://doi.org/10.1080/00087114.2010.10589707>
- Halpin, K.M., M. Fishbein. (2013). A Chloroplast Phylogeny of Agavaceae subfamily Chlorogaloideae: Implications for the Tempo of Evolution on Serpentine Soils. *Syst Bot* 38 (4):996-1011. <https://doi.org/10.1600/036364413x674850>
- Hasterok, R., T. Ksiazczyk, E. Wolny, J. Maluszynska. (2005). FISH and GISH analysis of genomes. *Acta Biol Cracov Bot* 47 (1):185-192
- Herrera, J.C., J.V. Romero, G.C. Camayo, C.M. Caetano, H.A. Cortina. (2012). Evidence of Intergenomic Relationships in Triploid Hybrids of Coffee (*Coffea* sp.) as Revealed by Meiotic Behavior and Genomic *in situ* Hybridization. *Trop Plant Biol* 5 (3):207-217. <https://doi.org/10.1007/s12042-012-9105-x>
- Humphreys, M.W., H.M. Thomas, W.G. Morgan, M.R. Meredith, J.A. Harper, H. Thomas, Z. Zwierzykowski, M. Ghesquiere. (1995). Discriminating the Ancestral Progenitors of Hexaploid *Festuca-Arundinacea* Using Genomic *in-Situ* Hybridization. *Heredity* 75:171-174. <https://doi.org/10.1038/hdy.1995.120>
- Jahan, B., A.A. Vahidy, R. Saeed, A.A. Mirbahar. (2014). Karyological Studies in Ten Different Populations of Desert Lily *Aloe Vera* from Pakistan. *Pak J Bot* 46 (5):1731-1734
- Kato, A., J.M. Vega, F. Han, J.C. Lamb, J.A. Birchler. (2005). Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. *Curr Opin Plant Biol* 8 (2):148-154. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.01.014>
- Lee, Y.S., H.M. Park, N.H. Kim, N.E. Waminal, Y.J. Kim, K.B. Lim, J.H. Baek, H.H. Kim, T.J. Yang. (2016). Phylogenetic relationship of 40 species of genus *Aloe* L. and the origin of an allodiploid species revealed by nucleotide sequence variation in chloroplast intergenic space and cytogenetic *in situ* hybridization. *Genet Resour Crop Ev* 63 (2):235-242. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0243-5>
- Leitch, I.J., A.R. Leitch. (2013). Genome Size Diversity and Evolution in Land Plants. In: Greilhuber J, Dolezel J, Wendel JF (eds) *Plant Genome Diversity Volume 2: Physical*

- Structure, Behaviour and Evolution of Plant Genomes. Springer Vienna, Vienna, pp 307-322. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1160-4\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1160-4_19)
- Magallón, S., A. Castillo. (2009). Angiosperm diversification through time. *Am J Bot* 96 (1):349-365. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800060>
- Markova, M., B. Vyskot. (2009). New Horizons of Genomic *in situ* Hybridization. *Cytogenet Genome Res* 126 (4):368-375. <https://doi.org/10.1159/000275796>
- McKain, M.R., J.R. McNeal, P.R. Kellar, L.E. Eguiarte, J.C. Pires, J. Leebens-Mack. (2016). Timing of rapid diversification and convergent origins of active pollination within Agavoideae (Asparagaceae). *Am J Bot* 103 (10):1717-1729. <https://doi.org/10.3732/ajb.1600198>
- McKain, M.R., N. Wickett, Y. Zhang, S. Ayyampalayam, W.R. McCombie, M.W. Chase, J.C. Pires, C.W. dePamphilis, J. Leebens-Mack. (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 (2):397-406. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100537>
- Pearce, S.R., U. Pich, G. Harrison, A.J. Flavell, J.S. Heslop-Harrison, I. Schubert, A. Kumar. (1996). The Tyl1-copia group retrotransposons of *Allium cepa* are distributed throughout the chromosomes but are enriched in the terminal heterochromatin. *Chromosome Res* 4 (5):357-364. <https://doi.org/10.1007/bf02257271>
- Qian, H., Y. Jin. (2016). An updated megaphylogeny of plants, a tool for generating plant phylogenies and an analysis of phylogenetic community structure. *J Plant Ecol* 9 (2):233-239. <https://doi.org/10.1093/jpe/rtv047>
- Ramos, L.C., M. Baez, J. Fuchs, A. Houben, R. Carvalho, A. Pedrosa-Harand. (2023). Differential Repeat Accumulation in the Bimodal Karyotype of *Agave* L. *Genes* 14 (2). <https://doi.org/10.3390/genes14020491>
- Rey, M.D., G. Moore, A.C. Martín. (2018). Identification and comparison of individual chromosomes of three accessions of *Hordeum chilense*, *Hordeum vulgare*, and *Triticum aestivum* by FISH. *Genome* 61 (6):387-396. <https://doi.org/10.1139/gen-2018-0016>
- Robert, M.L., K.Y. Lim, L. Hanson, F. Sanchez-Teyer, M.D. Bennett, A.R. Leitch, I.J. Leitch. (2008). Wild and agronomically important *Agave* species (Asparagaceae) show proportional increases in chromosome number, genome size, and genetic markers with increasing ploidy. *Botanical Journal of the Linnean Society* 158 (2):215-222. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2008.00831.x>
- Schubert, I., M.A. Lysak. (2011). Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends Genet* 27 (6):207-216. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.03.004>
- Sharma, A., G.G. Presting. (2008). Centromeric retrotransposon lineages predate the maize/rice divergence and differ in abundance and activity. *Mol Genet Genomics* 279 (2):133-147. <https://doi.org/10.1007/s00438-007-0302-5>
- Shibata, F., K. Nagaki, E. Yokota, M. Murata. (2013). Tobacco karyotyping by accurate centromere identification and novel repetitive DNA localization. *Chromosome Res* 21 (4): 375-381. <https://doi.org/10.1007/s10577-013-9363-y>
- Steele, P.R., K.L. Hertweck, D. Mayfield, M.R. McKain, J. Leebens-Mack, J.C. Pires. (2012). Quality and quantity of data recovered from massively parallel sequencing: Examples in Asparagales and Poaceae. *Am J Bot* 99 (2): 330-348. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100491>
- Stull, G.W., K.K. Pham, P.S. Soltis, D.E. Soltis. (2023). Deep reticulation: the long legacy of hybridization in vascular plant evolution. *The Plant Journal* 114 (4): 743-766. <https://doi.org/10.1111/tpj.16142>
- Tank, D.C., J.M. Eastman, M.W. Pennell, P.S. Soltis, D.E. Soltis, C.E. Hinchliff, J.W. Brown, E.B. Sessa, I.J. Harmon. (2015). Nested radiations and the pulse of angiosperm diversification: increased diversification rates often follow whole genome duplications. *New Phytol* 207 (2):454-467. <https://doi.org/10.1111/nph.13491>
- Ullah, I., H.A. Ansari, I.M. Verry, S.W. Hussain, N.W. Ellison, M.T. McManus, W.M. Williams. (2022). Introgression of *Trifolium ambiguum* Into Allotetraploid White Clover

**Recibido:**  
10/septiembre/2024

**Aceptado:**  
4/junio/2025

- (*Trifolium repens*) Using the Ancestral Parent *Trifolium occidentale* as a Bridging Species. *Front Plant Sci* 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.858714>
- Vimala, Y., S. Lavania, UC. Lavania. (2021). Chromosome change and karyotype differentiation-implications in speciation and plant systematics. *Nucleus Calcutta* 64 (1):33-54. <https://doi.org/10.1007/s13237-020-00343-y>
- Vondrak, T., L.A. Robledillo, P. Novak, A. Koblizkova, P. Neumann, J. Macas. (2020). Characterization of repeat arrays in ultra-long nanopore reads reveals frequent origin of satellite DNA from retrotransposon-derived tandem repeats. *Plant J* 101 (2):484-500. <https://doi.org/10.1111/tpj.14546>
- Wang, Q., Y. Wang, J.H. Wang, Z. Gong, G.Z. Han. (2021a). Plants acquired a major retrotransposon horizontally from fungi during the conquest of land. *New Phytol.* <https://doi.org/10.1111/nph.17568>
- Wang, Y.J., S.W. Wang, X.J. Jia, Z.R. Tian, Y.F. Wang, C.Y. Wang, H. Zhang, X.L. Liu, J.X. Zhao, P.C. Deng, W.Q. Ji. (2021b) Chromosome karyotype and stability of new synthetic hexaploid wheat. *Mol Breeding* 41 (10). <https://doi.org/10.1007/s11032-021-01253-w>
- Weiss-Schneeweiss, H, G.M Schneeweiss. (2013). Karyotype Diversity and Evolutionary Trends in Angiosperms. In: Greilhuber J, Dolezel J, Wendel JF (eds) *Plant Genome Diversity Volume 2: Physical Structure, Behaviour and Evolution of Plant Genomes*. Springer Vienna, Vienna, pp 209-230. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1160-4\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1160-4_13)
- Wu, Y.X., J.H. Chen, Q.L. He, S.J. Zhu. (2013). Parental origin and genomic evolution of tetraploid species by molecular marker and GISH analyses. *Caryologia* 66 (4):368-374. <https://doi.org/10.1080/00087114.2013.857830>
- Yu-xiang, W., C. Jin-hong, H. Qiu-ling, Z. Shui-jin. (2013). Parental origin and genomic evolution of tetraploid *Gossypium* species by molecular marker and GISH analyses. *Caryologia* 66 (4):368-374. <https://doi.org/10.1080/00087114.2013.857830>