

## CALIBRACIÓN DE *AMARANTHUS CRUENTUS* CV. DON GIEM COMO TESTIGO PARA EVALUAR TAMAÑO DEL GENOMA

LAURA DOPCHIZ<sup>1,2</sup>, EDUARDO J. GREIZERSTEIN<sup>1,2</sup> y LIDIA POGGIO<sup>1,2</sup>

**Summary:** Calibration of *Amaranthus cruentus* cv. Don Giem as standard to evaluate the genome size. The DNA content of *Amaranthus cruentus* L. cv. Don Giem was calibrated using the Opaco 2 maize line as standard. The data showed that *A. cruentus* cv. Don Giem does not have intraspecific variation, its calibrated average being  $2C = 1.29 \pm 0.012$  pg. This species is easily grown in laboratory and in natural conditions; each plant produces many seeds that germinate easily. Therefore, *A. cruentus* cv. Don Giem could be used as standard to evaluate genome size in an ample range of Angiosperm species, when 2C values are suspected to be low.

**Key words:** DNA content, calibration standards, *Amaranthus cruentus* cv. Don Giem.

**Resumen:** Se calibró el contenido de ADN de *Amaranthus cruentus* L. cv. Don Giem, utilizando la línea de maíz Opaco 2 como testigo. Los datos obtenidos indican que *A. cruentus* cv. Don Giem no posee variación intreaespecífica y que el valor promedio calibrado es de  $2C = 1,29 \pm 0,012$  pg. Esta especie es fácilmente cultivable tanto en laboratorio como en condiciones naturales; cada planta produce numerosas semillas que germinan fácilmente. Por lo tanto, *A. cruentus* cv. Don Giem podría ser utilizado como testigo para evaluar el tamaño del genoma en un amplio rango de especies de Angiospermas, cuando se sospeche que el valor 2C sea bajo.

**Palabras clave:** Contenido de ADN, calibración, *Amaranthus cruentus* cv. Don Giem.

### INTRODUCCIÓN

Las diferencias en el contenido de ADN pueden reflejar disimilitudes en la complejidad orgánica si se comparan virus, bacterias y plantas superiores. Si embargo, existen grandes variaciones entre grupos (animales y vegetales) que no difieren en complejidad ni requieren mayor número o tipo de genes (Bennett & Leitch, 1995). Las angiospermas poseen un amplio rango de variación en el contenido de ADN nuclear en el genoma básico (independientes del nivel de ploidía), mostrando una gran diversidad entre géneros y especies pertenecientes a una misma familia (Bennett & Smith, 1976; Bennett & Leitch, 1995; Poggio & Naranjo, 1990; Poggio & Hunziker, 1986; Bottini *et al.*, 2000). En este grupo, el contenido de ADN varía entre 0,2 pg en *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) a 127,4 pg en *Fritillaria assyriaca* Baker.

Los hechos mencionados llevaron a considerar al valor C (contenido de ADN del genoma haploide no replicado) como un enigma que fue resuelto, en gran parte, cuando se descubrió que la variación en el contenido de ADN (inter e intraespecífica) involucra un aumento en la cantidad y proporción de secuencias repetidas de ADN en el genoma nuclear (Flavell *et al.*, 1974), muchas de las cuales son no génicas y no transcriben (Orgel & Crick, 1980). Muchos autores consideran que las secuencias repetidas son ADN egoísta, parasítico, ignorante (Orgel & Crick, 1980; Doolittle & Sapienza, 1980). Por otro lado, varios autores han sugerido que las secuencias repetidas podrían contribuir al potencial evolutivo de las poblaciones (ver revisión en Bennett & Leitch, 1995). Se ha encontrado que la variación intra e interespecífica del tamaño del genoma está correlacionada en muchos organismos con caracteres fenotípicos a nivel cromosómico, celular, nuclear, y orgánico, así como con factores ecológicos, geográficos y fenológicos (Bennett 1972, 1987; Bennett & Smith, 1976; Bennett & Leitch, 1995; Bottini *et al.*, 2000; Grime & Mowforth 1982; Grime *et al.*, 1985; Grime, 1998; Laurie & Bennett, 1985; Tito *et al.*, 1991; Poggio *et al.*, 1998; Porter & Rayburn, 1990;

<sup>1</sup>Laboratorio de Citogenética y Evolución. Departamento de Ciencias Biológicas, FCEN, UBA, 1428, Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup>Instituto Fitotécnico de Santa Catalina (IFSC) (FCAF, UNLP), Centro de Investigaciones Genéticas (UNLP-CONICET-CIC) C. C. 4, 1836, Llavallol, Buenos Aires, Argentina.

Price *et al.*, 1998; Reeves *et al.*, 1998; Rosato *et al.*, 1998, entre otros). Esto indicaría que el tamaño del genoma posee valor adaptativo y que el ADN nuclear influencia el fenotipo por la expresión de su contenido génico y también por los efectos físicos de su masa y volumen.

Para medir el contenido de ADN se han usado numerosos métodos siendo la citometría de flujo y la microdensitometría con tinción de Feulgen los métodos más ampliamente utilizados en la actualidad (Bennett & Leitch, 1995). La tinción de Feulgen es específica para el ADN y los errores inherentes a la técnica pueden ser fácilmente controlados si se cuenta con un testigo cuyo valor de ADN sea conocido. Además, la utilización de un testigo adecuado permite que los valores obtenidos en unidades arbitrarias (UA) puedan ser convertidos en unidades absolutas (picogramos) (Bennett & Smith, 1976). Por otro lado, Bennett & Leitch (1995) señalan que se debe elegir un testigo que posea un tamaño del genoma con un valor lo más cercano posible al de la muestra que se desea evaluar. En el presente trabajo se recalibra el contenido de ADN de un cultivar de *Amaranthus* (Amaranthaceae) que fue creado por el Ing. G. Covas en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Anguil (Santa Rosa, La Pampa, Argentina) y que posee bajo contenido de ADN ( $2C = 1,26$  pg; Greizerstein & Poggio, 1994). *Amaranthus cruentus* L. cv. Don Giem reúne las características enunciadas por Bennett & Smith (1976) con respecto a la elección de un testigo y será de gran utilidad para ser utilizado al medir especies con muy bajo contenido de ADN.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Amaranthus cruentus* cv. Don Giem material legado por el Ing. Agr. G. Covas y mantenido bajo cultivo en la E. E. de Anguil, La Pampa y en el IFSC desde 1990.

*Zea mays* ssp. *mays* línea Opaco - 2 (Línea del IFSC).

Para calibrar el contenido de ADN de *A. cruentus* cv. Don Giem, se realizaron 3 experimentos (repeticiones) en diferentes días en 3 semanas sucesivas, manteniendo constantes las condiciones, utilizando como testigo la línea Opaco 2 de maíz calibrada por Rosato *et al.* (1997) y que posee, en relación a otros testigos disponibles, bajo contenido

de ADN: ( $2C = 6,658$  pg). Esta línea fue teñida y medida simultáneamente con *A. cruentus* cv. Don Giem. En cada preparación se coloca, en un extremo, un ápice del testigo y en el otro extremo un ápice de la muestra a analizar, colocando distintos cubreobjetos para evitar que se mezclen ambas muestras. De esta manera se controlan errores debidos a problemas inherentes a la preparación tales como mayor exposición a la luz de ese particular portaobjeto, distinta calidad del vidrio, etc. Si ocurren eventos que den bajas medidas en la muestra también se detectarán en el testigo. Ambos fueron medidos el mismo día.

El contenido de ADN fue medido en núcleos telofásicos ( $2C$ ) de ápices de raíces de semillas recién germinadas. Las raíces, de una longitud de 0,5-1 cm fueron fijadas en alcohol absoluto-ácido acético glacial (3:1) durante 24 hs a temperatura ambiente ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y luego conservadas durante 3 días a  $5^\circ\text{C}$ . Las raíces fueron lavadas en agua destilada durante 30 minutos (3 lavados de 10 minutos cada uno). La hidrólisis fue realizada con HCl 5N a  $20^\circ\text{C}$ . Para la determinación del tiempo óptimo de hidrólisis se construyó una curva analizándose los valores obtenidos con distintos tiempos de hidrólisis (20 a 90 minutos con intervalos de 10 minutos entre cada uno de ellos). Se determinó, a partir de dicha curva, que el tiempo óptimo (tiempo en el cual se obtuvo el mayor valor de ADN) fue de 40 minutos para amaranto y el testigo. Luego de la hidrólisis las raíces se lavaron tres veces en agua destilada durante períodos de 10 - 15 minutos cada uno. La tinción con el reactivo de Schiff pH 2.2 (Teoh & Rees, 1976) se realizó durante dos horas a  $20^\circ\text{C}$  en oscuridad. El material coloreado fue luego lavado en agua sulfurosa preparada en el momento (Cl H 5N y bisulfito de sodio 10%) tres veces durante 20 minutos cada vez. De esta manera, se elimina el Feulgen que hubiera quedado retenido en el citoplasma. Dado que el citoplasma se utiliza como zona testigo en las mediciones es importante que se elimine todo el colorante no unido al ADN. Los preparados fueron realizados por aplastado del ápice radical en una gota de ácido acético glacial 45 %. Luego se removió el cubreobjeto mediante congelación con hielo seco y se deshidrató con alcohol absoluto; los preparados se montaron en Euparal.

El contenido de ADN por núcleo, expresado en unidades arbitrarias (U. A.), es medido a una longitud de onda de 570 nm utilizando el método de ba-

ruido en un microespectrofotómetro Universal Zeiss (UMS 30). El contenido de ADN es expresado en pg ( $10^{-12}$  gr.) transformando las U. A. en pg (contenido de ADN de la muestra expresada en pg = contenido de ADN (pg) del testigo x absorbancia de la muestra (U. A.) / absorbancia promedio del testigo (U. A.). Cada experimento fue realizado en forma independiente. Para evaluar las diferencias de contenido de ADN en los diferentes experimentos se realizó un análisis de la varianza, utilizando el programa Statistica, subprograma ANOVA.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El conocimiento del tamaño del genoma es útil en diversos campos de la ciencia tales como biología celular, biología molecular, ecología, fitogeografía y sistemática, siendo numerosos los ejemplos en los cuales este dato aporta valiosa información en estudios de evolución, con especial referencia a mecanismos de aislamiento reproductivo y modos de especiación. En estudios moleculares conocer el tamaño del genoma permite estimar el número de clones necesarios para crear una librería genómica y fue un factor determinante en la elección de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* para secuenciar genomas completos. Por todo lo expuesto, se considera que el valor C es un carácter de importancia biológica fundamental y tiene valor predictivo en numerosos campos (Bennett & Leitch, 1995).

La medición de ADN por densitometría se basa usualmente en núcleos teñidos con Feulgen. Esta tinción es específica para el ADN y una vez que se ha eliminado el ARN por medio de la hidrólisis ácida existe proporcionalidad entre la densidad de tinción y el contenido de ADN. La luz absorbida por un núcleo teñido con Feulgen es una medida cuantitativa del contenido de ADN (Bennett &

Smith, 1976). Cuando el ADN es medido por este método los resultados se expresan en unidades arbitrarias (U. A.). Mediante el uso de una especie testigo cuyo contenido de ADN es conocido, estas unidades pueden ser convertidas en unidades absolutas (picogramos, dalton o en términos moleculares, tales como pares de nucleótidos ( $1 \text{ pg} = 10^{-12} \text{ gr.} = 965 \text{ Mb}$ ;  $1 \text{ Mb} = 10^6$  pares de nucleótidos). Bennett & Leitch (1995) sugieren que los testigos deben ser especies, líneas o variedades en las que se haya corroborado fehacientemente que poseen un tamaño constante del genoma.

Bennett & Smith (1976) calibraron varias especies utilizando *Allium cepa* L. cv. Ailsa Craig ( $2C = 33,5 \text{ pg}$ ) como testigo. Por otro lado, Bennett & Leitch (1995) señalan que al evaluar un nuevo taxón se debe elegir un testigo que posea un tamaño del genoma lo más semejante posible.

En la Tabla 1 se muestran los datos del contenido de ADN expresado en U. A. y en pg calculados midiendo como testigo en cada muestra *Zea mays* ssp. *mays*, línea Opaco 2 ( $2C = 6,658 \text{ pg}$ ). El análisis de la varianza muestra que no hay diferencias significativas dentro y entre los ensayos realizados en diferentes días ( $F = 0,551$ ;  $P < 0,01$ ). Los datos obtenidos indican que *A. cruentus* cv. Don Giem no posee variación intraespecífica y que el valor promedio calibrado es  $2C = 1,290 \pm 0,012 \text{ pg}$ . (Tabla 1). Este valor no difiere del obtenido por Greizerstein & Poggio (1994), siendo levemente mayor, aunque del mismo orden de magnitud, que el informado por Bennett & Smith ( $2C = 1,1 \text{ pg}$ , Bennett & Smith, 1991). Esta especie es fácilmente cultivable en condiciones de campo, cada planta produce numerosas semillas y los ápices radiculares se encuentran disponibles durante todo el año. Por lo tanto, *A. cruentus* cv. Don Giem podrá ser utilizado como testigo en un amplio rango de especies de angiospermas en las que datos previos sugieren que poseen valores relativamente bajos del tamaño del genoma.

**Tabla 1.** Estimación del contenido de ADN (2C) de *Amaranthus cruentus* cv. Don Giem expresado en pg de cada experimento utilizando como testigo *Zea mays* ssp. *mays*, línea Opaco 2 ( $2C = 6,658 \text{ pg}$ ) medido el mismo día.

Experimento	Media de cada día $\pm$ E.S. (en U.A.)	Nº de núcleos medidos (Nº de individuos)	Media de cada día de <i>Zea mays</i> ssp. <i>mays</i> $\pm$ E.S. (en U.A.)	Media de cada día corregida con <i>Zea mays</i> ssp. <i>mays</i> $\pm$ E.S. (en pg)
1	3,166 $\pm$ 0,0705	40 (2)	16,616 $\pm$ 0,181	1,268 $\pm$ 0,029
2	3,223 $\pm$ 0,034	40 (2)	16,423 $\pm$ 0,093	1,291 $\pm$ 0,014
3	3,213 $\pm$ 0,0381	60 (3)	16,133 $\pm$ 0,142	1,313 $\pm$ 0,011
	3,200 $\pm$ 0,0175			1,290 $\pm$ 0,012

Disponer de especies con amplio rango en el contenido de ADN minimiza errores inherentes a la técnica de microdensitometría con tinción de Feulgen. Cuando se desea utilizar una especie como testigo esta debe ser estable y no presentar variación intraespecífica. Existen numerosos trabajos informando la existencia de variación intraespecífica en el contenido de ADN de varios taxa. Muchos de estos casos han sido verificados o han podido ser explicados sobre la base de variación en heterocromatina o cromosomas accesorios (Cavallini & Natali, 1991; Poggio *et al.*, 1998; Porter & Rayburn, 1990; Bennett & Leitch, 1995). Otros autores en cambio, postulan que en varios grupos la variación intraespecífica sería el resultado de errores metodológicos (Greilhuber, 1998). Los errores inherentes a la técnica pueden ser fácilmente controlados si se cuenta con un testigo cuyo valor de ADN sea conocido, utilizado por más de un laboratorio y en varios grupos taxonómicos. Identificar especies con tamaño del genoma constante, calibrarla para que pueda ser utilizada como testigo y cultivarla para tener semillas disponibles para su distribución es un aporte importante para el estudio del tamaño del genoma.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar el profundo agradecimiento al Prof. Ing. Agr. Guillermo Covas por su constante apoyo y por el entusiasmo que nos transmitió por los estudios sobre Amarantos. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por su apoyo por medio de los PICT 01-04443 y 01-06583. Al CONICET por los fondos de funcionamiento del CIGEN. A la UBA por el subsidio TW01.

## BIBLIOGRAFÍA

- BENNETT, M. D. 1972. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proc. Royal Soc. London. B* 178: 109 - 135.
- BENNETT, M. D. 1987. Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New Phytologist* 106 (Suppl.): 177 - 200.
- BENNETT, M. D. & L. J. LEITCH. 1995. Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. *Ann. Bot.* 76: 113 - 176.
- BENNETT, M. D. & J. B. SMITH. 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Phil. Trans. Royal Soc. London B* 274: 227 - 274.
- BENNETT, M. D. & J. B. SMITH. 1991. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Phil. Trans. Royal Soc. London B* 334: 309 - 345.
- BOTTINI, M. J. C., E. J. GREIZERSTEIN, M. AULICINO & L. POGGIO. 2000. Relationships among genome size environmental conditions and geographical distribution in natural populations of NW Patagonian species of *Berberis* (Berberidaceae). *Ann. Bot.* 86: 565 - 573.
- CAVALLINI, A. & L. NATALI. 1991. Intraspecific variation of nuclear DNA content in plant species. *Caryologia* 44: 93 - 107.
- DOOLITTLE, W. P. & C. SAPIENZA. 1980. Selfish genes, the pheno type paradigm and genome evolution. *Nature* 284: 601 - 603.
- FLAVELL, R. B., M. D. BENNETT, J. B. SMITH & D. B. SMITH. 1974. Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochem. Genet.* 12: 257 - 269.
- GRIME, J. P. 1998. Plant classification for ecological purposes: is there a Role for Genome Size? *Ann. Bot.* 82 (Suppl. A) :117 - 120
- GRIME, J. P. & M. A. MOWFORTH. 1982. Variation in genome size - an ecological interpretation. *Nature* 299: 151 - 153.
- GRIME, J. P., J. M. L. SHACKLOCK & S. R. BAND. 1985. Nuclear DNA content, shoot phenology and species co-existence in a limestone grassland community. *New Phytol.* 100: 435 - 448.
- GREILHUBER, J. 1998. Intraspecific variation in genome size: A Critical Reassessment. *Ann. Bot.* 82. (Suppl. A) : 27 - 36.
- GREIZERSTEIN, E. J. & L. POGGIO. 1994. Karyological studies in grain *Amaranthus*. *Cytologia* 59: 25 - 30.
- LAURIE, D. A. & M. D. BENNETT. 1985. Nuclear DNA content in the genera *Zea* and *Sorghum*. Intergeneric, interspecific and intraspecific variation. *Heredity* 55: 307 - 313.
- ORGEL, L. E. & F. H. C. CRICK. 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284: 604 - 607.
- PRICE, H. L., P. W. MORGAN & J. S. JOHNSTON. 1998. Environmentally correlated variation in 2C nuclear DNA Content Measurements in *Helianthus annuus* L. *Ann. Bot.* 82. (Suppl. A) :95 - 98.
- POGGIO, L. & J. H. HUNZIKER. 1986. Evolutionary DNA content in *Bulnesia* (Zygophyllaceae). *J. Hered. (USA)* 77: 43 - 48.
- POGGIO, L. & C. A. NARANJO. 1990. Contenido de ADN y evolución en plantas superiores. *Acad. Nac. Cs. Ex. Fis. Nat., Buenos Aires, Monografía* 5: 27 - 37.
- POGGIO, L., M. ROSATO, A. M. CHIAVARINO & C. A. NARANJO. 1998. Genome size and environmental correlations in maize (*Zea mays* ssp *mays*, Poaceae). *Ann. Bot.* 82 (Suppl. A): 107 - 115.
- PORTEÑ, H. L. & A. L. RAYBURN. 1990. B-chromosome and C-band heterochromatin variation in Arizona maize populations adapted to different altitudes. *Genome* 33: 659 - 662.
- REEVES, G., D. FRANCIS, M. S. DAVIES, H. J. ROGERS & T. R. HODKINSON. 1998. Genome size is negatively correlated with altitude in natural populations of *Dactylis glomerata*. *Ann. Bot.* 82 (Suppl. A): 99 - 106.

L. Dopchiz *et al.*, Calibración de *Amaranthus cruentus* como testigo para evaluar el tamaño del genoma

- ROSATO, M., A. M. CHIAVARINO, C. A. NARANJO, J. CÁMARA HERNÁNDEZ, & L. POGGIO. 1998. Genome size and numerical polymorphism for the B chromosome in races of maize (*Zea mays* ssp. *mays*, Poaceae). *Amer. J. Bot.* 85: 168 - 174.
- ROSATO, M., C. A. NARANJO, & L. POGGIO. 1997. Recalibration of opaque-2 line of maize as a standard to estimate nuclear DNA amount. *Maize Genet. Cooper. Newsl.* 71: 49.
- TEOH, S. B. & H. REES. 1976. Nuclear DNA amount in populations of *Picea* and *Pinus* species. *Heredity* 36: 123 - 137.
- TITO, C. M., L. POGGIO & C. A. NARANJO. 1991. Cytogenetics studies in the genus *Zea*: 3. DNA content and heterochromatin in species and hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 83: 58 - 64.

Recibido el 10 de Diciembre de 2001, aceptado el 15 de Abril de 2002.