

Tesis de Posgrado

Estudios citogenéticos y de electroforesis de proteínas seminales en el género *Amaranthus* (Amaranthaceae)

Greizerstein, Eduardo José

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Greizerstein, Eduardo José. (1995). Estudios citogenéticos y de electroforesis de proteínas seminales en el género *Amaranthus* (Amaranthaceae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2753_Greizerstein.pdf

Cita tipo Chicago:

Greizerstein, Eduardo José. "Estudios citogenéticos y de electroforesis de proteínas seminales en el género *Amaranthus* (Amaranthaceae)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2753_Greizerstein.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

BIBLIOTECA CENTRAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Y NATURALES / UBA

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDIOS CITOGENÉTICOS Y DE ELECTROFORESIS DE
PROTEÍNAS SEMINALES EN EL GÉNERO *AMARANTHUS*
(AMARANTHACEAE)

POR

EDUARDO JOSE GREIZERSTEIN

DIRECTORA: DRA. LIDIA POGGIO

82270

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN
CIENCIA BIOLÓGICAS

1995

Dedico academicamente esta tesis al Ing. Agr. Guillermo Covas, quién ha sido un precursor de los estudios sobre los Amarantos en la Argentina y tiene como uno de sus objetivos en la vida que éste se transforme en un cultivo intensivo en el país

AGRADECIMIENTOS

Deseo en primer lugar expresar mi más profundo agradecimiento a la Dra. Lidia Poggio quién, además de introducirme al mundo de los amarantos y guiarme con sus consejos, sus críticas y sugerencias, me ha tratado como a un colega, ha trabajado codo a codo conmigo, me ha contagiado su entusiasmo por la citogenética y, lo que es para mí mucho más importante, me ha brindado su cariño y amistad. Sin todo lo que ella representa, este trabajo y ningún otro serían posibles.

Quisiera también agradecer al Dr. Carlos Alberto Naranjo, quién es el responsable de que me dedicara a la citogenética vegetal y quién me "engañó vilmente" ,al dirigirme en mi trabajo de seminario, con los cromosomas de *Zephyranthes* sin advertirme que también existían los de *Amaranthus*. Deseo también agradecer al Dr. Naranjo su "asesoramiento técnico" en la confección de las ilustraciones, sin los cuales éstas no hubieren podido ser realizadas. También debo agradecer al Dr. Naranjo, en su carácter de Director del Instituto Fitotécnico de Santa Catalina (FCAF, UNLP) y del Centro de Investigaciones Genéticas (UNLP-CIC-CONICET) por todas las facilidades que me ha brindado para el cultivo de los materiales estudiados, y por facilitarme el uso de los equipos e instalaciones. Dado que soy un "bien ganancial" del matrimonio, es muy importante para mí el expresar mi agradecimiento por todo el cariño y amistad que me ha brindado durante estos años.

Un recuerdo muy especial al Dr. Claudio Bidau, que fue el primero que se animó a trabajar conmigo y, con quién durante estos años hemos mantenido una amistad que perdura a pesar de la distancia.

Un agradecimiento muy especial a la Lic. Laura Dopchiz, "la alegría del Laboratorio", sin ella los días serían monótonos y aburridos. Ya no está sola en ese trabajo insalubre, llegó la Lic. Cecilia Bottini en su socorro.

A las Dras. Liliana Mola y Alba Papeschi les debo mi profundo reconocimiento por haberme bancado en todo , hacer de paño de lágrimas y por sus consejos en todo momento. Al Dr. Arturo Wulff por su amistad y su paciencia para escucharme.

A todos mis compañeros de laboratorio, con quienes he compartido largas horas de trabajo y cafés.

A la Universidad de Buenos Aires, por las facilidades que me brindara en mi calidad de becario .

Este trabajo pudo realizarse gracias a los subsidios otorgados a la Dra. Poggio por la UBA y el CONICET.

A Paty, mi técnica exclusiva, quién me ha acompañado en todos y cada uno de mis viajes de colección, conociendo la agradable sensación del acético en los dedos, rotulando los ejemplares de herbario, cuidando y regando las macetas.. A ella especialmente debo agradecer que, en los momentos más difíciles, me haya apoyado brindándome su amor y soportándome en todo momento. Gracias.

INDICE

	RESUMEN.	iii
I	INTRODUCCION GENERAL.	1
II	ESTUDIOS CROMOSOMICOS.	20
1	Análisis Cariotípicos.	20
1.1	Introducción.	20
1.1.1	Número cromosómico, Morfología y Simetría.	21
1.1.2	Contenido de DNA.	25
1.1.3	Heterocromatina.	30
1.2	Materiales utilizados.	34
1.3	Métodos.	37
1.3.1	Cariotipo y Simetría.	37
1.3.2	Microdensitometría.	39
1.3.3	Bandeo C.	45
1.4	Resultados.	49
1.4.1.	Número cromosómico somático, morfología y simetría.	49
1.4.2.	Contenido de DNA.	50
1.4.3.	Heterocromatina.	52
1.5.	Discusión.	65
1.5.1.	Morfología y Simetría.	65
1.5.2.	Contenido de DNA y heterocromatina.	67
2	Estudios Meióticos.	71
2.1	Introducción.	71
2.2	Materiales utilizados.	75
2.3	Métodos.	75
2.4	Resultados.	76
2.4.1	Comportamiento meiótico de las Especies y Cultivares.	76
2.4.2	Comportamiento meiótico de los Híbridos entre especies con $2n=32$ cromosomas.	77

2.4.3	Comportamiento meiótico de los híbridos entre especies con $2n=32$ y $2n=34$ cromosomas.	78
2.4.4.	Comportamiento meiótico de los híbridos entre especies con $2n=34$ y $2n=64$ cromosomas.	78
2.5.	Discusión.	89
III	ESTUDIOS ELECTROFORETICOS	102
1.	Introducción.	102
2	Materiales.	110
3	Métodos.	111
3.1.	Técnicas electroforéticas.	111
3.2.	Técnicas numéricas.	119
4.	Resultados.	123
4.1.	Electroforegramas.	123
4.2.	Análisis numérico.	124
4.2.1.	Coeficiente de similitud.	
4.2.1.2.	Análisis de agrupamientos.	124
4.2.1.3.	Construcción de fenogramas.	125
5.	Discusión.	135
IV	BIBLIOGRAFIA.	138

RESUMEN

A. La utilización de técnicas adecuadas ha permitido establecer con certeza, en varias especies del género *Amaranthus*, el número cromosómico, la descripción de las fórmulas cariotípicas y sus índices de asimetría. Además, se ha evaluado el contenido de DNA total y de heterocromatina en la mayoría de las especies analizadas. Las conclusiones más relevantes son:

- 1) En *Amaranthus* se han descrito, en general, dos números cromosómicos somáticos: $2n=32$ y $2n=34$. Ambos números han sido citados para algunas de las especies estudiadas. En este trabajo se determinó el número cromosómico en especies graníferas, en distintos cultivares de las mismas y en especies silvestres relacionadas. Estos estudios serán útiles para predecir resultados al elaborar planes de mejoramiento.
- 2) Las fórmulas cariotípicas y parámetros relacionados, tales como los índices de asimetría A_1 y A_2 permiten distinguir a las especies estudiadas hasta el momento (Tabla 3).
- 3) El contenido de DNA es un dato que complementa los restantes estudios cromosómicos realizados. Aquellas especies con mayor contenido de DNA poseen mayor contenido de heterocromatina y mayor período vegetativo (Tabla 4).
- 4) En algunos casos estos estudios permitieron aportar datos para clarificar situaciones conflictivas desde el punto de vista taxonómico. Así, por ejemplo, se apoyó la hipótesis de que *A. powellii* y *A. bouchonii* deberían ser consideradas dos buenas especies biológicas por diferir en número cromosómico, fórmula cariotípica, contenido de DNA total y heterocromatina.

B. Pese a la importancia del amaranto como potencial cultivo alternativo, hay muy pocos estudios de híbridos interespecíficos tanto en especies cultivadas como en silvestres. Estos estudios son importantes desde el punto de vista agronómico y evolutivo. El análisis del comportamiento

meiótico de 13 híbridos interespecíficos espontáneos y el de sus especies progenitoras permitió estimar la afinidad genómica entre las especies, analizar el tipo de aislamiento postcigótico existente entre las mismas y predecir el éxito de ciertas combinaciones híbridas en planes de mejoramiento. Además, este estudio aportó datos que permiten resolver situaciones taxonómicas conflictivas en la delimitación específica de algunos taxa.

- 1) En las especies con $2n=32$ y $2n=34$ se observó una meiosis regular con formación de 16 ó 17 bivalentes respectivamente. *A. dubius* que posee $2n=64$ cromosomas, presentó meiosis regular con formación de 32II. También fué elevado en las mismas, el porcentaje de polen teñido mediante el colorante de Alexander (90-98%).
- 2) Los híbridos entre especies con $2n=32$ cromosomas mostraron siempre meiosis aparentemente regular, con formación de 16II. En algunos casos se observaron bivalentes heteromorfos. Estos serían consecuencia del apareamiento de cromosomas entre especies que difieren en su contenido de DNA total, siendo esta diferencia más notable en algunos pares de cromosomas. La tinción de polen de los híbridos, como una evaluación indirecta de su fertilidad, varió considerablemente (0-60%). La baja viabilidad del polen asociada con meiosis regular sugiere que en los híbridos existiría hibridez estructural críptica. Las especies diferirían en rearrreglos estructurales pequeños que, pese a la formación de bivalentes, disminuyen la fertilidad de los individuos híbridos. No puede descartarse la existencia de diferentes combinaciones génicas responsables de éste fenómeno.

Es interesante destacar que al analizar el híbrido *A. hybridus* x *A. quitensis* se encontró que la viabilidad de polen estimada es del 60%, indicando que ambas especies estarían relacionadas, pero no pertenecerían al mismo taxon específico como fue sugerido por otros autores sobre la base de estudios morfológicos.

Las mayores diferencias con los resultados informados por otros autores se encuentran en híbridos donde *A. hybridus* esta involucrado como progenitor. Siendo esta una especie polimórfica, el apareamiento cromosómico en

híbridos puede verse influenciado por el genotipo paterno. La gran variabilidad en *A. hybridus* sería la causa de la discrepancia encontrada entre los resultados de distintos autores (Figura 24).

3) Los híbridos entre especies con $2n=32$ y $2n=34$ cromosomas tales como *A. cruentus* x *A. quitensis* y *A. caudatus* x *A. cruentus* formaron $15II+1III$ en todas las células presentando una baja viabilidad del polen (5-7%).

El híbrido *A. hybridus* ($2n=32$) x *A. spinosus* ($2n=34$) mostró $8II+17I$ en la mayoría de las células sugiriendo que ambas especies poseerían sólo 8 cromosomas homólogos. Esto sugiere que los números básicos del género serían $x=8$ y $x=9$, siendo $x=16$ y $x=17$ números derivados. Otra observación que apoyaría esta hipótesis es la frecuente presencia de asociación secundaria de bivalentes en especies e híbridos. Sobre esta base, las especies actuales de *Amaranthus* serían tetraploides (alotetraploides).

4) El híbrido *A. spinosus* x *A. dubius* presentó $17II+15I$ en la mayoría de las células estudiadas. Este hecho apoyaría la hipótesis que sugiere que los bivalentes formados se deberían al apareamiento alosindético entre 17 cromosomas de *A. spinosus* y 17 de los 32 cromosomas de *A. dubius*, los 15 cromosomas restantes de *A. dubius* se mantendrían como univalentes. Este resultado sugiere que *A. spinosus* sería uno de los progenitores de *A. dubius*.

5) Las observaciones meióticas de los híbridos, analizados en su conjunto, permitió postular una fórmula genómica para cada una de las especies analizadas (Tabla 9)

C. La utilización de los perfiles de proteínas seminales, obtenido por electroforesis, se ha revelado como una técnica útil para la caracterización de especies y cultivares. El fenograma de la figura.33 muestra que se forman dos grupos a un nivel de similitud de 0,47. Estos grupos están formados por las especies graníferas y por *A. spinosus*. Dentro de *A. spinosus* se distinguen los distintos orígenes estudiados.

Dentro de las especies graníferas se forman dos grupos a un nivel de similitud de 0,5. Uno de ellos está formado por *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* y el otro por *A. mantegazzianus* y *A. caudatus*.

A. hypochondriacus se diferencia de *A. cruentus* a un nivel de similitud de 0,65, mientras que, *A. mantegazzianus* se diferencia de *A. caudatus* a un nivel de similitud de 0,69.

Dentro de *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* se pueden discriminar los cultivares analizados, mientras que los pertenecientes a *A. cruentus* y *A. mantegazzianus* son indistinguibles electroforéticamente.

I INTRODUCCION GENERAL

El género *Amaranthus* (nombre derivado del griego que significa inmarcesible, es decir, que no se marchita, por la textura escariosa de sus flores) comprende más de 50 especies herbáceas, en su mayoría anuales, que crecen preferentemente en zonas cálidas o templado-cálidas, originarias de América. Se conocen diez especies dióicas (*A.greggii*, *A. arenicola*, *A. watsoni*, *A. palmieri*, *A. tamariscinus*, *A. floridanus*, *A. tuberculatus*, *A. australis*, *A. cannabinus* y *A. acanthochiton*) (Murray, 1940; Sauer, 1955; 1956), mientras que el resto son monoicas. Las especies dioicas son originarias de América del Norte (Sauer, 1955; 1956), las especies monoicas, en cambio, se distribuyen desde el sur de los Estados Unidos de América hasta las regiones centrales de Argentina y Chile (Covas, 1984).

Las flores, casi siempre unisexuales, están reunidas por lo común en inflorescencias compuestas, siendo las inflorescencias elementales dicasios o monocasios; prevalecen las flores monoicas, que constan de perigonio escarioso de 2 a 5 tépalos, cada flor con una bráctea basal. Las flores masculinas constan de 2 a 5 estambres, con anteras tetraloculares, dorsifijas, en tanto que las flores femeninas tienen de 2 a 5 tépalos y un pistillo unilocular, uniovulado, con 2 a 4 ramitas estigmáticas. El fruto es un utrículo con los tépalos persistentes en la base del mismo, siendo indehiscente o con dehiscencia circuncisa (pixidio), en cuyo ápice perduran las ramitas estigmáticas. La semilla es en

general de forma lenticular, ovoide u oblonga, erecta, con un embrión anular rodeando el albumen central harinoso (Covas, 1984).

La distribución de las semillas se realiza por medio del viento o la lluvia. Luego de la maduración y la caída de las semillas, la planta muere (Standley, 1917). El sistema reproductivo es principalmente por autofecundación existiendo, según diferentes autores, distintos grados de alogamia. Walton (1968) lo estima en aproximadamente un 20%, mientras que Jain *et al.* (1982), en base a estudios isoenzimáticos lo estima en un rango del 3.5 al 14% para poblaciones de *A. hypochondriacus* de la India y del 3 al 25% para diversas plantas individuales coleccionadas en la India y Sud América.

En este género muchas especies se hibridan con facilidad y los híbridos son en muchos casos parcialmente fértiles, dando lugar a plantas morfológicamente intermedias, lo que unido a la gran variación de las características morfológicas de las especies, hacen a menudo dificultosa la identificación de los taxa. Según Covas (1984) estas características "sugieren que se trataría, al parecer, de un género filogenéticamente nuevo con procesos de especiación en pleno desarrollo".

La taxonomía del género *Amaranthus*, comenzando por las dos secciones en las que se ha dividido (*Amaranthus* y *Blitopsis*), hasta la delimitación de las especies, es bastante conflictiva. La sección *Amaranthus* incluye todas las especies graníferas, la mayoría de las ornamentales y de las hortícolas. Por mucho tiempo se conoció a la sección bajo el nombre de *Amaranthotypus* Dumort. Bajo las presentes reglas de clasificación, actualmente lleva el mismo nombre del género ya que incluye a la especie tipo: *Amaranthus caudatus* L. La

sección se caracteriza por la siguiente combinación de caracteres: plantas monoicas, la inflorescencia es una cima terminal grande y compuesta que se extiende por encima de las hojas superiores. Consta de cinco tépalos y estambres (o variables entre 3 a 5 en flores de la misma planta). El utrículo es dehiscente circunciso (Hunziker, 1943; Sauer, 1950; 1967). La sección *Blitopsis* se diferencia de la anterior por presentar las inflorescencias en glomérulos axiales, a veces pequeñas panojas o racimos terminales, flores dímeras a tetrámeras y utrículos indehiscentes (Covas, 1991).

Algunas especies han sido cultivadas como ornamentales (*A. hypochondriacus*, *A. hybridus*, *A. tricolor*) mientras que otras fueron y son utilizadas como pseudocereales (*A. cruentus*, *A. caudatus*, *A. mantegazzianus*, *A. hypochondriacus*) (Figuras 1 a 6), u hortícolas (las hojas de plantas jóvenes se hierven y se consumen como verdura). Variedades de *A. lividus* y *A. tricolor* cultivadas en Asia han sido introducidas en Occidente como "Espinaca China", "Espinaca Malabar" o "Tampala". También algunos cultivares de *A. mantegazzianus* o *A. dubius* son utilizados con fines hortícolas. Otras especies del género son utilizadas como forrajeras. Mientras que los cereales son monocotiledoneas de la familia de las gramíneas caracterizadas por poseer un grano grande de albumen abundante y harinoso, los pseudocereales, tales como el amaranto, poseen semillas de cualidades semejantes pero de menor tamaño y pertenecen a diferentes familias de dicotiledoneas

Muchas especies del género poseen un elevado contenido de proteínas y vitaminas, sobre todo vitamina C en sus hojas y semillas, conteniendo estas últimas una alta proporción de lisina (6% del total de proteína), siendo también

importantes la cantidad de treonina, cistina y valina, con un total de proteínas de hasta un 18% del peso de las semillas (Becker *et al.*, 1981). Otra de las propiedades interesantes de la semilla de amaranto es su alto contenido de ácidos grasos polisaturados que, además de su valor nutritivo, son de gran utilidad en la industria farmacéutica. Las semillas tienen también propiedades emulsificantes y gelificantes que pueden ser aprovechadas en las industrias alimentarias en la elaboración de diversos productos, como agregados al yogurth, en las sopas tipo crema y helados entre otros. Con la harina se pueden elaborar panes (combinado con harina de trigo), galletas, pasteles etc. A todas estas características se suma el que no poseen gluten, haciéndolos muy importantes en la alimentación de los celíacos (Martinez Ungria, 1989).

Son muy tolerantes a la sequía y poseen un sistema fotosintético muy eficiente pues son especies C_4 , poco frecuente en las dicotiledoneas, caracterizado por su alta eficiencia en el aprovechamiento de la energía involucrada en el proceso de fotosíntesis (Covas, 1984).

El origen de las especies de amaranto graníferas aún no está resuelto. Sauer (1967) plantea dos hipótesis acerca del posible origen de los amarantos cultivados. La primera de ellas propone que cada especie cultivada se habría originado a partir de un progenitor silvestre: *A.cruentus* de *A.hybridus* en el suroeste de México o Guatemala, que son los sitios en donde se encuentran cultivos aborígenes de *A. cruentus* dentro del rango de distribución de *A. hybridus*; *A.hypochondriacus* de *A.powellii* por selección como cereal dentro la región de cultivo aborígen en Norte América; y *A.caudatus* de *A.quitensis* en la región andina. La otra hipótesis considera la posibilidad de que dos o aún tres de las

especies de amarantos provengan de una única especie inicialmente domesticada. Por ejemplo, *A.hybridus* origina a *A.cruentus* en las regiones húmedas de América Central y luego es llevada a las regiones más secas en donde se encuentra *A.powelli* como maleza. Por reiterados cruzamientos con esta última, habría dado origen a *A.hypochondriacus*. La migración de *A.cruentus* hacia el Sur y cruzamientos reiterados con *A.quitensis* habría dado origen a *A.caudatus*, este último sería el progenitor de la otra especie cultivada: *A.mantegazzianus*, nativa de la Argentina. La segunda hipótesis de Sauer (1967) postula un antecesor común, lo que permitiría explicar la presencia de caracteres compartidos por todas las especies cultivadas, tales como la presencia de semillas claras, lo cual sería más difícil de justificar como evolución convergente en tres líneas independientes.

Khoshoo y Pal (1972) comentan que cualquiera sea su origen las especies graníferas surgieron de uno o varios progenitores silvestres por domesticación.

Mediante estudios isoenzimáticos Hauptli y Jain (1984) postulan que las distancias genéticas, basadas en la frecuencias alélicas, indican que las especies cultivadas están más relacionadas entre sí que con sus presuntos progenitores silvestres. Esto implicaría un sólo evento de domesticación con *A. hybridus* como antecesor común y no tres eventos independientes. Estos autores también señalan la pequeña distancia genética existente entre *A. quitensis* y *A. caudatus*, lo que implicaría que ésta última habría sido originada por la primera.

Hunziker (1991) considera que por lo menos dos de las especies actualmente cultivadas: *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* tuvieron su centro de origen en lo que ahora es México o por lo menos son originarias de las actuales América

del Norte y de América Central, mientras que otras especies serían originarias de Sudamérica y fueron particularmente importantes en el gran reino incaico. Este es posiblemente el caso de *A. caudatus* y *A. mantegazzianus*, también muy cultivados actualmente, sobre todo la primera, en Perú, Ecuador, Bolivia y el norte de Argentina.

El cultivo del amaranto se conoce desde hace por lo menos 4000 años antes de Cristo, según los hallazgos arqueológicos realizados en Perú, México y Estados Unidos. Una evidencia convincente del uso del amaranto por los humanos proviene de los trabajos de Mac Neish (1964) realizados en cuevas ubicadas en el desierto de Tehuacan, en la zona central de México. En ellas encontró semillas secas y partes de flores de amarantos, asociados a utensilios humanos y, lo que es más importante, restos de semillas en deposiciones humanas. También Hunziker y Planchuelo (1971) informan del hallazgo de frutos de *Amaranthus caudatus* en el yacimiento denominado Gruta del Indio del Rincón de Atuel en la provincia de Mendoza, cuya datación muestra una antigüedad de 2000 años. Esto indicaría una domesticación paralela de diversas especies de amaranto en la zona andina de Sudamérica.

En México, los Mayas fueron los primeros en adaptarlo como cultivo. En la parte central de México el amaranto constituyó junto con el maíz, los porotos y la calabaza uno de los cultivos básicos en la alimentación hasta la conquista. También los Aztecas lo consumían cotidianamente combinado con el maíz y otros granos logrando, de este modo, una dieta balanceada. El aprecio por el amaranto se reflejó también en los ritos religiosos que realizaban a lo largo del año, para lo cuales confeccionaban figuras con el grano simulando animales o

ídolos. Una detallada descripción de esas ceremonias está descrita en el Código Ramírez de alrededor de 1550. Allí se describe las ceremonias de mayo, en honor a Huitzilopochtli, el "Dios de la Guerra" que se celebraban en el Templo Pirámide de Tenochtitlan, la capital azteca, ubicada en la actual ciudad de México. En esta ceremonia se reunía el pueblo, se tocaba música, se realizaban bailes rituales y existían sacrificios humanos. El principal evento era el desfile de ídolos realizados en amaranto, con forma de Huitzilopochtli que eran paseadas por la ciudad en literas. Al final de las ceremonias el ídolo era partido en pequeñas piezas y consumido ritualmente por la población. Se estima que en la época anterior a la conquista, se llegaron a producir alrededor de 15 a 20.000 toneladas anuales de grano. Cierta proporción de la cosecha, era entregada como tributo al Emperador Moctezuma. A la llegada de los primeros conquistadores, éstos se sorprendieron al encontrar grandes almacenes de amarantos, ocupando el tercer lugar en importancia, después del maíz y los porotos (Velasco Lozano y Heyden, 1989). Cuando Hernán Cortes invadió a los aztecas en 1519 y posteriormente en 1535 Francisco Pizarro a los incas, comenzaron por abolir sus ceremonias religiosas y su cultura. A fin de destruir la religión y suprimir sus ritos "bárbaros" proscibieron el cultivo del amaranto. Los conquistadores destruyeron e incendiaron millares de campos de cultivo y amputaban las manos o mataban a quienes seguían comiendo amaranto (Kalinowski, 1988).

Recién en la década de los '70 se redescubre la potencialidad del amaranto como un nuevo-antiguo cultivo. En Argentina se han realizado estudios botánicos (Hunziker 1943; 1951; 1965; 1966), nutricionales (Bertoni y Cattaneo,

1988). De gran importancia son los trabajos realizados por el Ing. Guillermo Covas en la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de la Pampa y en el INTA Anguil, quién desde hace 25 años realiza, fundamentalmente, estudios de genética, mejoramiento y técnicas de cultivo en el género. También los Ingenieros Jorge Gesumaría y Guillermo Peireti, de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba realizan estudios de mejoramiento genético de los amarantos con resultados muy prometedores. Por iniciativa del Ing. Covas, en 1987 se realizaron las Primeras Jornadas Nacionales sobre Amarantos en Santa Rosa, La Pampa, en la cual se presentaron trabajos referidos a la taxonomía, fisiología, genética, aspectos agronómicos y nutricionales del género. En 1992 se realizaron las segundas Jornadas en la Ciudad de San Salvador de Jujuy. También el interés del amaranto a nivel internacional se ha reflejado en la realización del Primer Congreso Internacional del Amaranto en México en el año 1991.

Los estudios acerca de la relación entre los amarantos cultivados y sus progenitores silvestres desde el punto de vista citogenético comenzaron a fines de la década de 1950. Grant (1959a) describió el número cromosómico $n=16$ en las especies dioicas *A. arenicola*, *A. australis*, *A. tamariscinus* y *A. tuberculatus* y $n=17$ en *A. palmieri*. Las especies monoicas presentan, también, números gaméticos $n=16$ y $n=17$. Esto estaría indicando que la condición aneuploide surgió tempranamente, mientras que el hábito dioico sería un fenómeno secundario que habría aparecido posteriormente (Grant, 1959b). Todos los estudios realizados hasta el momento indican la existencia de dos números básicos, $x=16$ y $x=17$, encontrándose, en algunos casos, ambos números citados

para la misma especie (Grant, 1959a; Khoshoo y Pal, 1972; Pal, 1972; Pal y Khoshoo, 1973a, b; Pal *et al.*, 1982; Poggio, 1988). Estos números básicos se encuentran tanto en la sección *Amaranthus* como en la sección *Blitopsis*, aunque en esta última hay preponderancia de especies con $n=17$. En la Tabla 1 se reseñan los números cromosómicos somáticos y gaméticos informados previamente por diversos autores. Pal y Khoshoo (1973a) sugieren que $x=17$ habría derivado de $x=8$ y $x=9$ (números básicos comunes en *Amaranthaceae*) y Pal *et al.* (1982) postulan que $x=17$ habría surgido de $x=16$ por trisomía primaria.

Se han realizado numerosos estudios del comportamiento meiótico en especies pertenecientes a ambas secciones, en híbridos interespecíficos tanto naturales como artificiales y en poliploides artificiales con la finalidad de analizar los sistemas reproductivos y los mecanismos implicados en la evolución de las especies (Behera y Patnaik, 1974; 1982; Desai, 1971; Grant 1959 a, b, c; Khoshoo y Pal, 1972; Pal, 1972; Pal y Khoshoo, 1972; 1973 a y b; Pal *et al.* 1982).

Pese a ello existe, aún, una gran cantidad de combinaciones híbridas no analizadas, entre ellas las que poseen a *A. quitensis* y a *A. mantegazzianus* como una de las especies progenitoras. Esta última es una especie de gran potencial económico y *A. quitensis* es importante dada su distribución cosmopolita siendo una maleza de difícil erradicación en cultivos tales como maíz y soja.

Son escasos los estudios cariotípicos en el género. Ello podría deberse a que Grant (1959) sugirió que debido al pequeño tamaño de los cromosomas,

los estudios morfológicos de los mismos son impracticables y que no existirían, además, diferencias en el tamaño absoluto entre las especies de *Amaranthus*. Palomino y Rubí (1991) informaron las formulas cariotípicas de algunas cultivares de *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*. El contenido de DNA nuclear fue medido por Ohri et al. (1981) en *A. hypochondriacus*, *A. mantegazzianus* (*A. edulis*) y *A. tricolor* no encontrando diferencias significativas entre las tres especies.

Tampoco son muchos los trabajos sobre las relaciones filogenéticas de las especies de amarantos sobre la base de estudios isoenzimáticos (Hauptli y Jain, 1984; Jain et al., 1980; Burghardt y Poggio, 1990). En todos ellos se concluye que pese a la gran variabilidad fenotípica que presentan, las especies de amarantos estudiadas poseen un gran porcentaje de loci monomórficos

En la presente tesis se han realizado análisis citogenéticos, con especial atención a las especies cultivadas como pseudocereales y sus especies relacionadas. Estos estudios se han realizado para diferenciar las especies a través de la morfología de sus cromosomas, simetría de sus cariotipos, contenidos de DNA, cantidad y ubicación de la heterocromatina constitutiva. También se analizó el comportamiento meiótico de híbridos entre las especies graníferas del género y algunas especies silvestres con la finalidad de analizar las relaciones genómicas, los mecanismos de aislamiento reproductivo y aportar datos a los ya existentes acerca del origen y los modos de especiación preponderantes en el género.

Como ya fue expresado anteriormente, el género *Amaranthus* presenta dificultades al momento de caracterizar taxonómicamente a las especies. Por

este motivo se realizaron estudios de electroforesis de proteínas seminales para la caracterización de especies y cultivares.

En la presente tesis se utilizaron materiales con procedencia conocida y determinaciones taxonómicas precisas y esperamos que los datos aportados puedan aclarar muchas de las contradicciones encontradas hasta el momento en la literatura.



Figura 1. *A. caudatus*: aspecto general



Figura 2. *A. cruentus*: aspecto general



Figura 3. *A. hypochondriacus*: aspecto general



Figura 4. *A. mantegazzianus*: aspecto general

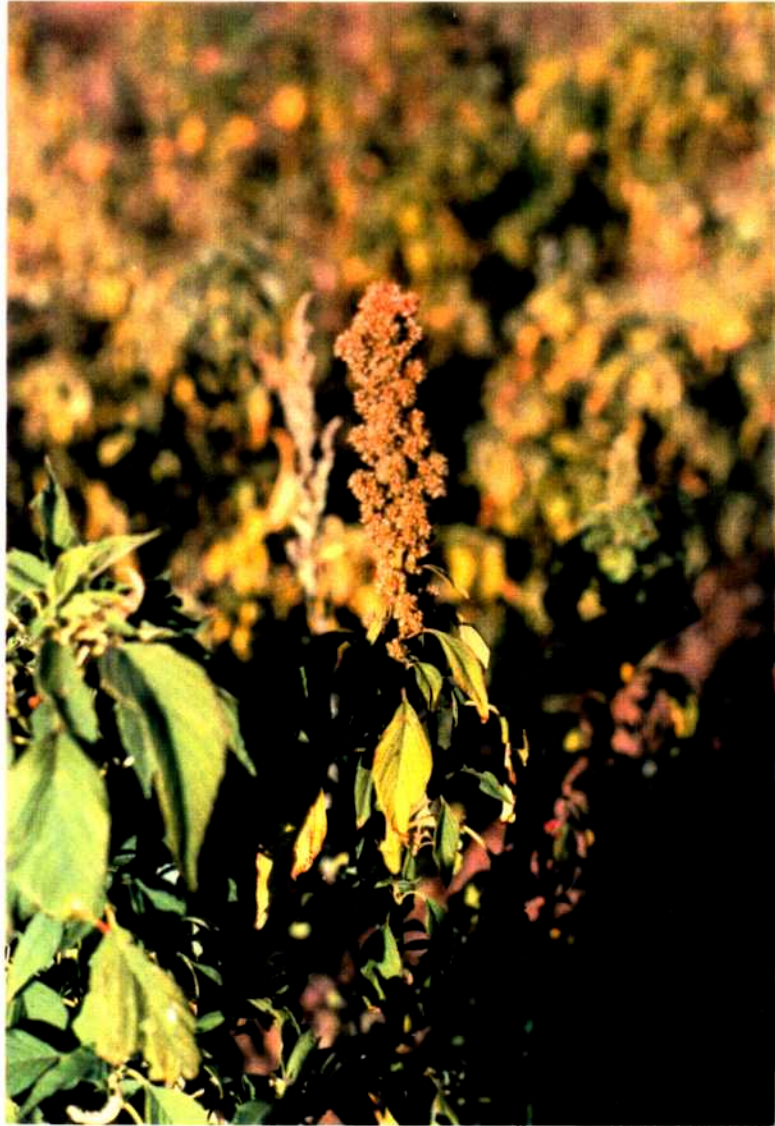


Figura 5. *A. mantegazzianus* x *A. quitensis*: detalle de inflorescencia



Figura 6. *A. caudatus* x *A. mantegazzianus*: detalle de inflorescencia

Tabla 1: Números cromosómicos informados para el género *Amaranthus* L

Especie	n	2n	Autores
<i>A. acutilobus</i> Uline & Bray		32	Grant, 1959c
<i>A. albus</i> L		32	Grant, 1959c
	16		Madhusoodanan & Pal, 1981
		32	Fritsch, 1973
		32	Hindakova & Schwarzova, 1978
		32	Murin & Chaudhri, 1970
		32	Mulligan, 1957
	16		Mulligan, 1984
		32	Queiros, 1989
		32	Dmitriova, 1986
	17	34	Sharma & Banik, 1965
<i>A. angustifolius</i> Lam		32	Miège, 1960
		32	Grant, 1959c
<i>A. arenicola</i> John		32	Grant, 1958; 1959a
<i>A. artropurpureus</i> L.	17	34	Sharma & Banik, 1965
<i>A. aureus</i> Bess.		32	Grant, 1959c
		32	Pal & Pandley, 1989
		34	Tandon & Tawakley, 1970
<i>A. berlandieri</i> (Moq.)Uline & Bray		34	Grant, 1959c
<i>A. blitoides</i> S. Wats		32	Bjorkquist et a, 1969
		32	Hindakova, 1978
		32	Carretero, 1984
		32	Dmitriova, 1986
		32	Queiros, 1989
		32	Krahulcová, 1990
<i>A. blitum</i> L	8		Malik & Ahmad, 1963
	17		Behera & Patnaik, 1974
		34	Tandon & Tawakley, 1970
		34	Hügin et al, 1987
<i>A. bouchonii</i> Thell		32	Pogan et al., 1982
		32	Hügin et al, 1987
<i>A. brownii</i> Christoph	17		Carr, 1985
<i>A. cartutus</i> Heine		32	Malik & Ahmad, 1963
		32	Behera & Patnaik, 1974
<i>A. caudatus</i> L.	16		Behera & Patnaik, 1974
	16	32	Grant, 1959c
		32	Tandom & Tawakley, 1970
	16		Coons, 1982
	16		Pal, 1972
	16		Pal & Khoshoo, 1973
	64		Pal & Pandey, 1982
<i>A. caudatus*</i>	32		Pal, 1972
	32		Pal & Khoshoo, 1973
		32	Madhusoodanan & Nazeer, 1983
		32	Xu, Y., 1987
		32	Pal & Pandley, 1989
var gibbosus		30	Xu, Y, 1987
<i>A. chlorostachys</i> Willd		32	Majovsky et al., 1970
<i>A. crispus</i> (Lesp & Thev) Terrac.		34	Hindakova & Schwarsova, 1980
		34	Grant, 1959c

*=autopoliploides artificiales

Tabla 1. (continuación)

Especie	n	2n	Autores
<i>A. cruentus</i> L.		32	Tandon & Tawakley, 1970
		32	Dmitriova, 1986
		34	Grant, 1959c
		34	Pal & Pandley, 1989
			Rubí y Palomino, 1991
var <i>cruentus</i>		32	Auquier & Renard, 1975
<i>A. deflexus</i> L.		34	Kliphuis & Wieffering, 1972
		34	Grant, 1959c
		34	Carretero, 1984
		34	Queiros, 1989
<i>A. dubius</i> Mart ex Thell	32	64	Grant, 1959b
	32		Pal, 1964
	32		Pal, 1972
	32		Behera & Patnaik, 1977
		32	Behera & Patnaik, 1982
		32	Baquar & Olusi, 1988
<i>A. fimbriatus</i> (Torr)Benth.	17		Ward & Spellenberg, 1986
<i>A. edulis</i> Speg.		32	Tandon & Tawakley, 1970
	16		Pal, 1972
	16		Pal & Khoshoo, 1973
<i>A. edulis</i> *	32		Pal, 1972
	32		Pal & Khoshoo, 1973
		64	Pal & Pandley, 1982
<i>A. emarginatus</i> Moq. ex Uline & Bray			
		34	Hürgin, 1987
ssp. <i>emarginatus</i>		34	Hürgin, 1987
ssp. <i>pseudogracilis</i> (Thell) Hürgin		34	Hürgin, 1987
<i>A. flavus</i> L.		32	Pal & Pandley, 1989
<i>A. gangeticus</i> L.	17	34	Sharma & Banik, 1965
	17		Sharma, 1970
		34	Tandon & Tawakley, 1970
<i>A. giganteus</i> L.		32	Behera & Patnaik, 1973
		34	Sharma & Banik, 1965
<i>A. graecizans</i> L.		32	Grant, 1959c
		32	Murin & Schwarzova, 1979
		32	Auquier & Renard, 1975
		32	Queiros, 1989
	17		Madhusoodanan & Pal, 1981
		34	Madhusoodanan & Nazeer, 1983
		17	Pal, 1972
	17	Pal & Khoshoo, 1973	
ssp. <i>graecizans</i>		32	Baquar & Olusi, 1988
ssp. <i>sylvestris</i>		34	Paiva & Leitao, 1989
		32	Carretero, 1984
<i>A. gracilis</i> Desf.	17		Covas & Hunziker, 1954
	17		Behera & Patnaik, 1974
	17		Sidhu, 1979
	17		Pal, 1972
	17		Pal & Khoshoo, 1973
		34	Bir & Sidhu, 1980
		34	Sidhu & Bir, 1983

*=autopoliploides artificiales

Tabla 1. (continuación)

Especie	n	2n	Autores	
<i>A. hybridus</i> L.	16	32	Grant, 1959c	
		32	Tandon & Tawakley, 1970	
		32	Auquier & Renard, 1975	
		16	Pal, 1972	
		16	Pal & Khoshoo, 1973a	
		16	Behera & Patnaik, 1974	
		16	Ward, 1984	
		32	Xu, Y., 1987	
		32	Queiros, 1989	
		34	Pal et al., 1982	
		34	Strid & Franzen, 1981	
		34	Pal & Pandley, 1989	
		ssp <i>hypochondriacus</i>	32	Hindacova, 1974
			32	Majovsky et al., 1974
		<i>A. hypochondriacus</i> L.	16	32
32	Majovsky et al., 1974			
32	Pal et al., 1982			
32	Pal, 1972			
	16	32	Pal & Khoshoo, 1973	
		34	Pal & Pandley, 1989	
		34	Tandon & Tawakley, 1970	
		34	Rubl y Palomino, 1991	
<i>A. hypochondriacus</i> *	32		Pal, 1972	
			Pal & Khoshoo, 1973	
<i>A. leucocarpus</i> S. Wats.	16	32	Grant, 1959c	
		32	Pal, 1964	
<i>A. lividus</i> L.	17	34	Tandon & Tawakley, 1970	
		34	Pal & Khoshoo, 1973	
		34	Pal, 1972	
		34	Pal & Khoshoo, 1973	
		34	Grant, 1959c	
		34	Tandon & Tawakley, 1970	
		34	Madhussodanan & Pal, 1981	
		34	Madhussodanan & Nazeer, 1983	
		34	Dmitriova, 1986	
		34	Dalgaard, 1986a	
		34	Queiros, 1989	
		34	Baqar & Olusi, 1988	
		34	Kiehn et al., 1991	
		34	Auquier & Renard, 1975	
		34	Carretero, 1984	
ssp. <i>polygonoides</i> (Zoll.) Thell.		34	Hindakova, 1978	
ssp. <i>ascendens</i> (Lois) Thell.		34	Hindakova, 1978	
		34	Frey, 1971	
ssp. <i>ascendens</i> (Lois) Henk.		34	Carretero, 1984	
<i>A. mangostanus</i> L.	17	34	Behera & Patnaik, 1974	
		34	Tandon & Tawakley, 1970	
<i>A. mantegazzianus</i> Passer.		32	Grant, 1959c	
<i>A. muricatus</i> Gillies ex Moq.	17		Covas & Hunziker, 1954	
<i>A. muricatus</i> (Moq.) Hieron		34	Carretero, 1984	

*=autopoliploides artificiales

Tabla 1. (continuación)

Especie	n	2n	Autores
<i>A. palmieri</i> S. Wats.	17		Reveal & Spellemborg, 1976
	17	34	Grant, 1958; 1959a
<i>A. paniculatus</i> L.		30,32,34	Xu, Y., 1987
		32	Pal & Pandley, 1989
		34	Tandon & Tawakley, 1970
		34	Queiros, 1989
<i>A. polygamus</i> L.	17	34	Sharma & Banik, 1965
	17,34		Desai, 1971
<i>A. powellii</i> S. Wats		32	Hürgin et al, 1987
		34	Grant, 1959c
		34	Mulligan, 1961
	17	34	Mulligam, 1969
		34	Pal & Pandley, 1989
		34	Kiehn et al., 1991
<i>A. quitensis</i> HBK		32	Grant, 1959c
	16		Heiser, 1963
<i>A. retroflexus</i> L.		32	Krasnikov & Lomonosova, 1990
		34	Grant, 1959c
		34	Majovsky et al., 1974
		34	Mulligan, 1961
		34	Kliphuis & Barkoudah, 1977
		34	Javurkova, 1980
		34	Uhríkova, 1974
		34	Frey, 1971
	17		Mulligan, 1984
		34	Dmitriova, 1986
		34	Pal & Pandley, 1989
		34	Queiros, 1989
<i>A. salicifolius</i> Hort.		34	Tandon & Tawakley, 1970
<i>A. spinosus</i> L.	16		Subramanyam & Kamble, 1966
	17	34	Grant, 1959b
	17	34	Sharma & Banik, 1965
	17	34	Hsu, 1967
	17		Sharma, 1970
		34	Tandon & Tawakley, 1970
	17		Pal, 1964; 1972
		34	Miege & Josserand, 1972
	17		Behera & Patnaik, 1974, 1977
	17		Behera & Patnaik, 1982
	17		Koul et al., 1976
	17		Sidhu, 1979
		34	Bir & Sidhu, 1980
		34	Renard et al., 1983
		34	Baquar & Olusi, 1988
		34	Paiva & Leitao, 1989
<i>A. standleyanus</i> Parodi	17		Covas & Hunziker, 1954
<i>A. tamariscinus</i> Nutt.	16	32,48	Grant, 1958, 1959a

*=autopoliploides artificiales

Tabla 1. (continuación)

Especie	n	2n	Autores
<i>A. tricolor</i> L.		34	Grant, 1959c
		34	Sharma & Banik, 1965
	17		Behera & Patnaik, 1974
	17		Madhusoodanan & Pal, 1976,
	17		Madhusoodanan & Pal, 1981
		34	Madhusoodanan & Nazeer, 1983
		34	Tandon & Tawakley, 1970
		34	Li, R., 1989
		34	Baquar & Olusi, 1988
		34	Paiva & Leitao, 1989
		34	Li, R., 1989
		17,34	Madhusoodanan & Pal, 1983
	var <i>salicifolius</i>	17	
	17		Pal & Khoshoo, 1973
var. <i>tristis</i>	17		Behera & Patnaik, 1974
<i>A. tuberculatus</i> (Moq) Sauer		34,64	Grant, 1958, 1959a
<i>A. viridis</i> L.		34	Grant, 1959c
	17	34	Sharma & Banik, 1965
	17		Pal, 1964
	17		Sharma, 1970
		34	Tandon & Tawakley, 1970
	17		Gill & Vasudeva, 1970
	17		Bir & Sidhu, 1975
	17	34	Bir & Sidhu, 1979
	17		Madhusoodanan & Pal, 1981
		34	Madhusoodanan & Nazeer, 1983
		34	Dalgaard, 1986
		34	Baquar & Olusi, 1988

* = autopoliploides artificiales

II ESTUDIOS CROMOSOMICOS

La citogenética es la genética estudiada por medio de los cromosomas y consiste en el análisis de todas sus características (visibles al microscopio óptico, electrónico ó cuantificables por métodos citoquímicos o moleculares) y las funciones de los mismos, poniendo especial énfasis en el comportamiento general durante las divisiones celulares (Poggio, 1994). Estos análisis son muy importantes en los estudios biosistemáticos (Grant, 1987).

La utilización de los caracteres citológicos para resolver problemas taxonómicos ha sido denominada citotaxonomía (Rieger *et al.*, 1991). Las relaciones entre grupos naturales de especies no pueden considerarse completos en un sentido evolutivo sin datos cromosómicos que refuercen las conclusiones basadas en datos morfológicos, bioquímicos o moleculares.

1. ANALISIS CARIOTIPICO

1.1 INTRODUCCION

En algunas ocasiones se han considerado a los cromosomas como estructuras estáticas que diferencian distintos grupos y no siempre es así, pues son parte de un sistema dinámico que está moldeando el proceso evolutivo.

El conjunto de características morfológicas del complemento cromosómico de una especie, observadas en metafase mitótica, ha sido llamado **cariotipo**.

Si bien el cariotipo se estudia, en general, en metafase mitótica en ápices de meristemas radiculares, en ciertos grupos, tales como Liliales, se realizan cariotipos gametofíticos a partir de la primera división microspórica. En Briofitas los cariotipos gametofíticos son los usuales (Stebbins, 1971). Las características comúnmente utilizadas para la descripción de un cariotipo son: número cromosómico; número básico; tamaño absoluto del complemento cromosómico; tamaño relativo de los cromosomas; posición del centrómero; número, tipo y posición de los satélites y su correspondencia con el número y posición de los NOR's activos revelados por tinción con Ag; cantidad, calidad y posición de la heterocromatina; contenido de DNA; zonas de rDNA reveladas por hibridación in situ y todas aquellas características adicionales que puedan ser reveladas por las técnicas utilizadas.

1.1.1. Número cromosómico, morfología y simetría

Los recuentos cromosómicos proveen una información útil con respecto al número mínimo de grupos de ligamiento. El número cromosómico puede variar entre individuos o poblaciones de una especie y no necesariamente habrá cambios en el exofenotipo. *Bromus pictus* y *B. setifolius*, por ejemplo, son entidades simpátricas que eran consideradas variedades de una misma especie debido a su gran similitud morfológica. Naranjo *et al.* (1989) hallaron que *B. pictus* es tetraploide ($2n=4x=28$) y *B. setifolius* es decaploide ($2n=10x=70$). Aunque los autores describen, además, otras características citológicas que diferencian ambos taxa, esto no se refleja en el exofenotipo.

Cuando se realizan estudios poblacionales se pueden analizar polimorfismos o politipismos para variaciones numéricas o estructurales. El número básico es un carácter muy utilizado en biosistemática, pero basarse sólo en él para establecer relaciones filogenéticas puede llevar a consideraciones erróneas ya que los cambios en el número básico debidos a rearrreglos estructurales también pueden ocurrir sin que se produzcan cambios observables en la morfología. A nivel poliploide pueden ocurrir reestructuraciones que originen nuevos números básicos que ya no tendrán relación directa con los ancestrales. Además, pueden aparecer números básicos nuevos derivados por hibridación entre taxa con diferentes números básicos. En complejos poliploides maduros los diploides ancestrales pueden estar extinguidos y en estos casos no siempre es sencillo conocer el número básico original del grupo (Stebbins, 1971).

Las diferencias en tamaño cromosómico pueden deberse a diferencias en contenido de DNA. Esto, dependiendo del tipo de DNA involucrado, tendría diferentes implicancias. Si las regiones involucradas son eucromáticas, es decir codificantes, el resultado podría ser la existencia de genes duplicados, tal como ocurre en el caso de las hemoglobinas en animales o los distintos tipos de citocromos en las plantas. Si por el contrario los cambios son en regiones heterocromáticas, estos cambios no tendrían implicancias a nivel fenotípico. Por otra parte, las diferencias en morfología cromosómica también pueden indicar diferencias en la ubicación de los genes, debidas a rearrreglos estructurales, lo cual al modificar las relaciones de ligamiento puede tener consecuencias, a veces drásticas, en los procesos de recombinación y segregación génica.

En muchos géneros el número y, a veces, la morfología cromosómica es constante entre las distintas especies que lo componen como por ejemplo, en *Hippeastrum* (Naranjo y Andrada, 1975). En este género se analizaron alrededor de 40 especies y todas poseen $2n=22$ cromosomas con una morfología altamente conservativa. La gran constancia cromosómica hallada en *Hippeastrum* permitió establecer la existencia de una considerable discontinuidad, a nivel citogenético, con la especie tipo del género monotípico *Amaryllis belladonna*. Este estudio permitió resolver una polémica de más de 50 años sobre la relación entre los género mencionados (Naranjo y Poggio, 1988). En otros casos el número cromosómico permanece constante entre especies pero existen variaciones importantes en otras características cariotípicas. En el género *Bulnesia*, por ejemplo, siete de las ocho especies son diploides con $2n=26$ cromosomas. Poggio y Hunziker (1986) y Poggio *et al.* (1989) encontraron importantes diferencias en la morfología, simetría del cariotipo y contenido de DNA total. Estos ejemplos indican que no sólo es importante considerar el número de cromosomas sino también el tamaño de los mismos, la relación de brazos, la posición de las constricciones primarias y secundarias y todas las características que permitan un estudio completo del cariotipo y su simetría.

La escuela rusa de morfología comparativa del cariotipo, ha desarrollado el concepto de **simetría** y **asimetría** del cariotipo (citado por Stebbins, 1971). Un cariotipo simétrico es aquél en el cual los cromosomas tienen todos aproximadamente el mismo tamaño y con centromeros medianos o submedianos. Un cariotipo sería más asimétrico entonces, cuando los cromosomas posean centrómeros más terminales o cuando existen diferencias notorias en el tamaño

relativo de los cromosomas dentro de un complemento (cariotipo bimodal). El concepto de simetría y asimetría cromosómica considera dos parámetros: la asimetría (o simetría) intracromosómica. y la asimetría (o simetría) intercromosómica. Ambos parámetros pueden ser evaluados mediante los índices A_1 y A_2 propuestos por Romero Zarco (1986). El incremento de la asimetría se produce por la modificación de la posición de los centrómeros de medianos a terminales o subterminales a través de la acumulación de diferencias en tamaño relativo de los cromosomas del complemento haciéndolo, de este modo, más heterogéneo.

Según Stebbins (1971) existiría una tendencia, en las angiospermas, hacia el incremento de la asimetría del cariotipo. Esto sería claro en *Crepis* y otros géneros de Compuestas. En *Delphinium* (Ranunculaceae) el cariotipo asimétrico estaría asociado a flores altamente especializadas, mientras que otras especies de la familia presentan cariotipos más simétricos y flores menos especializadas. Por otra parte Jones (1978) sostiene que la evolución cromosómica es un proceso continuo en el cual los cromosomas están sujetos a todo tipo de cambios durante su pasaje a través de varias formas de vida. Dado que los mismos tienen una expectativa de vida mucho mayor que la de los organismos que controlan, durante la evolución pueden sufrir eventos de aumento o disminución de la simetría. Por lo tanto, según la opinión de Jones (1978), en cada grupo de plantas el estudio de la morfología cromosómica debe ser integrado con otros estudios para determinar la dirección del cambio cromosómico durante la evolución. En conclusión, la descripción de la simetría del cariotipo no permite realizar inferencias acerca de la dirección del cambio evolutivo, ya que

los distintos grupos pueden tener ciclos de asimetría-simetría cariotípica que confunde la relación secuencial entre los cariotipos y hay que ser muy cauteloso al usar los términos ancestral y derivado cuando se manejan sólo datos cromosómicos (Poggio, 1994).

1.1.2. Contenido de DNA

En los organismos superiores, el complemento cromosómico está formado por dos o más genomas básicos derivados de las gametas parentales. A nivel molecular el genoma puede ser definido como todas las secuencias de DNA encontradas en los cromosomas (Flavell, 1983; Grant, 1987).

Las angiospermas poseen un amplio rango de variación en el contenido de DNA nuclear, mostrando una gran diversidad entre géneros y especies pertenecientes a una misma familia. Aunque gran parte de esa diversidad se debe a la existencia de poliploidía, existen muchos ejemplos de variación inter e intra-específica en el contenido de DNA por genoma e independientes del nivel de ploidía (Poggio y Naranjo, 1990).

Cuando el contenido total de DNA nuclear de las plantas superiores se compara con el que poseen los musgos, las algas y hongos, se observa, en general, que al aumentar el nivel de complejidad en organización estructural, la tendencia general evolutiva es el aumento del tamaño cromosómico y la cantidad de DNA genómico. Por otro lado, cuando se comparan diferentes grupos de plantas vasculares esto no se observa, ya que géneros que pertenecen a familias muy especializadas tales como Crucíferas (*Arabidopsis*), Gramíneas (*Panicum*) y Gesneriaceas poseen menor contenido total de DNA que géneros

más primitivos tales como *Psilotum*, *Tmesipteris*, *Lycopodium* y *Botrychium* (Stebbins, 1971). Por lo tanto, la gran variación en contenido de DNA que existe entre y dentro de taxones no está correlacionada con complejidad morfológica o evolutiva. El hecho de que organismos con el mismo nivel de complejidad morfológica y los mismos requerimientos genéticos tengan genomas cuyo contenido de DNA difieran en varios órdenes de magnitud ha llevado al concepto de "paradoja del valor C" (Thomas, 1971) dado que no es claro aún su origen y significado biológico.

La elucidación de dicha paradoja surgirá del conocimiento de los diversos tipos de secuencias de DNA y sus efectos no codificantes o nucleotípicos en el desarrollo (Bennett, 1972, Price, 1976, Cavalier-Smith, 1978, Poggio y Naranjo, 1990).

Existen numerosos ejemplos de variación interspecífica, por ejemplo Sims y Price (1985) encontraron diferencias de 162 unidades de absorbancia entre especies del género *Helianthus*, desde la de mayor contenido de DNA (*H. agrestis*) y la de menor contenido de DNA (*H. neglectus*) (Grant, 1987). Poggio *et al.* (1986) encontraron grandes diferencias en contenido de DNA entre siete especies diploides relacionadas del género *Bulnesia* en donde *B. sarmientoi* posee 0,72pg, llegando a 4,54pg en *B. retama*.

La variación intraespecífica también puede ser considerable (*Poa annua* 80%, *Zea mays* 37%, Bennett y Smith, 1976, Bennett, 1985; Tito *et al.*, 1991).

En un gran número de angiospermas, se encontró que los poliploides pueden presentar valores de contenido de DNA semejantes (en el caso de ser recientes) o menores (en el caso de poliploides antiguos) que las especies

diploides relacionadas (Bennett, 1987; Poggio y Naranjo, 1990; Poggio *et al.*, 1989).

Existen numerosos ejemplos en la literatura que indican que tanto el incremento como la disminución del contenido de DNA parecen ser comunes en la evolución de plantas eucarióticas (Price, 1988).

Las variaciones intracromosómicas en el contenido de DNA resultan, en general, en cambios en la forma y tamaño de los cromosomas. Rees (1984) señaló que los complementos cromosómicos con elevado contenido de DNA son más simétricos que los de especies relacionadas con menor contenido. Por el contrario, en *Bulnesia* la especie con mayor contenido de DNA (*B. retama*) posee el cariotipo más asimétrico, y el mayor porcentaje de heterocromatina. La asimetría del cariotipo en esta especie se debe a la adición de bloques terminales o intercalares de heterocromatina en un sólo brazo cromosómico en 24 de los 26 cromosomas del complemento (Poggio y Hunziker, 1986; Poggio *et al.*, 1986; Poggio *et al.*, 1992; Poggio y Naranjo, 1990). En *Hippeastrum*, en cambio, la variación interespecífica en el contenido de DNA ocurre en forma proporcional en todo el complemento, manteniendo constante el cariotipo (Poggio y Naranjo, 1990).

De estos ejemplos se puede concluir que el aumento del contenido de DNA puede conducir a una mayor asimetría cromosómica (*Bulnesia*) o a una mayor simetría cromosómica (*Hippeastrum*). También si la ganancia o pérdida del DNA no se produce en todos los cromosomas del complemento se originan cariotipos bimodales. Esto implica que la morfología cromosómica y el contenido de DNA sólo podrán sugerir la dirección de los cambios evolutivos si se

integran a otros datos tales como sistema reproductivo o fenotipo externo o bioquímico (Poggio, 1994).

En la mayoría de los casos analizados se ha visto que cambios en el contenido de DNA involucran ganancia o pérdida de secuencias de DNA repetido (Britten y Kohne, 1968, Flavell *et al.*, 1974, Flavell, 1986, Preisler y Thompson, 1981). Para explicar el origen y la evolución de las secuencias repetidas se han propuesto varios mecanismos moleculares tales como la replicación saltatoria, la retrotransposición, el intercambio desigual y la replicación con deslizamiento (Smith, 1976, Walsh, 1987).

Se ha especulado mucho sobre las razones de la acumulación o disminución del DNA repetido. Algunos autores consideran a las secuencias de DNA repetido como no adaptativas o simplemente parásitas (Orgel y Crick, 1980, Doolittle y Sapienza, 1980). Otros autores han señalado, sin embargo, que el contenido de DNA está positivamente correlacionado con varios parámetros celulares, tales como: el volúmen nuclear (Baetcke *et al.*, 1967), el volúmen celular (Price *et al.*, 1973, Cavalier-Smith, 1978), duración del ciclo mitótico (Van't Hof y Sparrow, 1963, Van't Hof, 1965, Evans y Rees, 1971) y la duración de la mitosis y meiosis (Bennett, 1971). La sumatoria de los efectos del contenido de DNA sobre el fenotipo, independientemente de sus funciones codificantes es lo que Bennett (1972) denominó **nucleotipo**. El nucleotipo influencia en términos de espacio y tiempo los eventos que están cualitativamente determinados por el genotipo (Bachmann *et al.*, 1979). Por lo tanto esto sugiere que el contenido de DNA, a través de sus efectos nucleotípicos, ejerce una influencia sobre la expresión del genotipo, de tal manera que bajo ciertas circunstancias

la selección favorece la acumulación de secuencias de DNA nuclear y bajo otras condiciones, la pérdida de DNA no codificante sería favorecido por la selección natural (Bennett, 1972, Price, 1976, Bachmann *et al.*, 1985). Los efectos nucleotípicos de la reducción del contenido de DNA se manifiestan en la reducción de la duración del ciclo mitótico y meiótico, lo cual puede ser ventajoso en algunos ambientes (Bennett, 1972; Price, 1988).

El contenido de DNA a menudo se expresa en términos de valor C. Este término fue utilizado por primera vez por Swift (1950) en un intento por evitar la confusión con el número cromosómico. De esta manera, un núcleo diploide ($2n=2x$) en profase y un núcleo tetraploide ($2n=4x$) en interfase temprana, tienen ambos el valor 4C de contenido de DNA a pesar de contener ambos un número distinto de cromosomas. La letra C significa "constante", pues Swift suponía que el contenido de DNA sería constante para un dado genotipo. *El valor C para cualquier genotipo es el contenido de DNA del complemento haploide no duplicado* (Bennett y Smith, 1976).

El contenido de DNA puede ser expresado en valores arbitrarios, a menudo expresados como porcentaje del contenido de DNA de una especie tomada como unidad de medida (Rothfels y Heimbürger, 1968) o a la que se da arbitrariamente el valor 100 (Chooi, 1971). Por ejemplo cuando la estimación se realiza por densitometría, los resultados, a menudo, se expresan en unidades tales como "unidades de absorción de Feulgen". La mayoría de las unidades arbitrarias no pueden ser convertidas en unidades absolutas si no es por medio de dificultosos ensayos de calibración y eso las hace poco útiles (Bennett y Smith, 1976).

El contenido de DNA absoluto puede ser expresado de varias maneras: a) puede ser expresado en unidades de masa, tanto en picogramos (pg.) ($1\text{pg.}=10^{-10}\text{g.}$) o en dalton; b) puede ser expresado en términos moleculares, tales como pares de nucleótidos. (Sparrow *et al.*, 1972).

Desde el punto de vista citogenético y de evolución cromosómica, la cuantificación del contenido de DNA en especies relacionadas constituye un elemento adicional para analizar los cambios ocurridos durante o con posterioridad, al proceso de especiación. Así, en más de una oportunidad, la determinación del valor C ha permitido detectar variaciones entre especies con cariotipos aparentemente similares (Rao y Rai, 1985; Rees y Jones, 1972; Rees *et al.*, 1978; Poggio y Naranjo, 1990).

1.1.3. Heterocromatina:

En los organismos eucariotas, el material genético está empaquetado en cromosomas, los cuales se tornan visibles al condensarse durante la mitosis y la meiosis. Según su comportamiento durante el ciclo de división a la cromatina se la puede dividir en **euromatina** y **heterocromatina**. La euromatina sufre un ciclo de condensación y descondensación durante dicho ciclo de división. Por el contrario, la heterocromatina es acíclica, es decir, permanece siempre condensada, salvo al replicarse.

El término **heterocromatina** fue introducido por Heitz (1928) para referirse a aquellas regiones de los cromosomas que, sin aplicar ningún pretratamiento, permanecen condensadas y más intensamente teñidas en interfase, profase temprana y telofase y que se diferencian de los segmentos por su tinción dife-

rencial de los segmentos eucromáticos. Esta definición original se refería exclusivamente a un fenómeno citológico que actualmente se denomina **heteropicnosis positiva** (Rieger *et al.*, 1991). Implícita en la definición original de Heitz, está el convencimiento de que toda la cromatina que se mantenía condensada en el estado intermitótico pertenecía a una única clase. En términos generales, la asociación DNA-proteínas puede existir en el período interfásico en dos conformaciones distintas: difusa o condensada. Esta diferencia en estado refleja diferentes niveles de condensación que son el resultado de la interacción del DNA con proteínas cromosómicas (John, 1987). Los estudios autorradiográficos con Uridina tritiada demostraron que la síntesis de RNA sólo es posible en el estado difuso o descondensado, por lo tanto, la cromatina condensada es transcripcionalmente inactiva (Ris y Korenberg, 1979).

Una región cromosómica puede ser inactiva transcripcionalmente por dos razones bastante diferentes: 1) Inactivación reversible del DNA codificante: **heterocromatina facultativa**. o 2) DNA no codificante y por lo tanto, incapaz de transcribir en forma permanente: **heterocromatina constitutiva**.

La heterocromatina facultativa es un tipo de heterocromatina en la cual segmentos cromosómicos, cromosomas completos y, a veces, grupos de cromosomas se inactivan y condensan durante etapas tempranas del desarrollo y permanecen inactivados durante varias generaciones celulares en algunos tejidos somáticos. Un ejemplo de ello es la heterocromatización al azar de uno de los cromosomas X de las hembras de mamíferos y que en interfase se la observa como una región intensamente teñida: Corpúsculo de Barr.

La heterocromatina constitutiva está compuesta, predominantemente, de regiones altamente repetitivas de DNA no codificante, por lo tanto esta cromatina es permanentemente no transcripcional y representa un tipo de cromatina estructuralmente distinto de la eucromatina. Según John (1987) el uso del nombre heterocromatina para nombrar a la eucromatina que facultativamente se inactiva es tanto inadecuado como erróneo.

Las observaciones de Heitz se basaron en el estudio comparativo de las diversas fases del ciclo mitótico pero sin brindar una explicación en términos biológicos de la definición morfológica de la heterocromatina. Más adelante, con el advenimiento de las técnicas de bandeado cromosómico y de genética molecular se intentó caracterizar con mayor precisión esas zonas heterocromáticas de DNA. Si bien al principio de estos estudios se consideró que toda la heterocromatina constitutiva era revelada por el bandeo C y que por otra parte todas las zonas C positivas estaban constituidas por heterocromatina, estudios posteriores demostraron la existencia de algunas excepciones (Amos y Dover, 1981; Sumner, 1982).

Pardue y Gall (1970) encontraron por medio de hibridación in situ que la heterocromatina centromérica de cromosomas de ratón estaba constituida por DNA satélite. Estos resultados, junto con otros semejantes, permitieron postular que las regiones C⁺ estaban constituidas por DNA satélite o DNA altamente repetido. Por otra parte varios trabajos (Sumner, 1982) han descrito que las zonas heterocromáticas de los cromosomas contienen una amplia variedad de tipos de DNA y algunas bandas C⁺ no contienen ningún tipo de DNA satélite o altamente repetido. Como conclusión puede suponerse que a pesar de que las

bandas heterocromáticas contienen, a menudo DNA altamente repetido, hay pocos casos donde se pueda afirmar que las bandas están compuestas exclusivamente por DNA repetido.

1.2 MATERIALES UTILIZADOS

Amaranthus albus L.. Legado G. Covas. Cultivado en el IFSC bajo los números 89-321; 90-839; 90-857; 91-401; 91-454;.-Santa Rosa, La Pampa. Legado G. Covas. Cultivado en el IFSC bajo los números 91-400; 92-405.

Amaranthus bouchonii Thellung. Kew 0027078. Cultivado en el IFSC bajo los números 90-851;Kew 30999. Cultivado en el IFSC bajo los números 92-423; 93-577.

Amaranthus caudatus L. Legado por G. Covas. Cultivado en el Instituto Fito-técnico de Santa Catalina (UNLP) (IFSC) bajo los números 89-325; 90-843; 92-494. .-var Sanguineus Covas 1004. Jard. Bot. Fac. Agr. UBA. Leg. G. Covas. Cultivado en el IFSC 89-314; 90-842; 91-414; 92-491. .-Perú. Kalinovsky 88/W. Legado G. Covas. Cultivado en el IFSC bajo los números 89-307; 90-847; 91-413; 92-493. .-var "Love lies bleeding". Legado G. Covas. Cultivado en el IFSC bajo los números 91-412; 92-495.

Amaranthus crispus Terrac. Kew 28226. Cultivado en el IFSC bajo los números 92-426; 92-504; 93-576.

Amaranthus cruentus L. cv Don Giem. La Pampa. Legado G. Covas. Cultivado en el IFSC bajo los números 89-308; 89-313; 90-825; 91-417; 92-484; 92-485. .-cv Don Armando. La Pampa. Legado G. Covas Cultivado en el IFSC bajo los números 89-303; 91-418. .-Mexico. Legado G. Covas. Cultivado en el IFSC bajo los números 89-333; 90-830; 91-420; 91-466; 92-486.

Amaranthus deflexus L. Santa Rosa, La Pampa GC 024. Legado G. Covas. Cultivado en el IFSC bajo los números 89-318; 90-831; 90-853, 91-411; 91-459; 92-483. .-Bahia Blanca. CBV 7303. Legado Villamil. Cultivado en el IFSC bajo los números 91-445; 92-482.

Amaranthus dubius Mart. ex Thell. kew 0006574. Cultivado en el IFSC bajo los números 90-854; 92-425; 93-575. .-Veracruz, Mexico. Legado G. Covas. Cultivado en el IFSC bajo el número 92-414.

Amaranthus hybridus L. Legado G. Covas. Cultivado en el IFSC bajo los números 89-322; 89-327; 90-841; 90-862; 91-433; 92-464. .-Mexico GC 175 Legado G. Covas. Cultivado en el IFSC bajo los números 91-432; 92-463. .-kew 32465 Cultivo 92-421.

Amaranthus hypochondriacus L. Mexico Legado G. Covas. Cultivado en IFSC bajo el número 89-301; 90-849; 91-425; 92-467. .-Mexico (semilla negra). Legado G. Covas. Cultivado en el IFSC bajo los números 89-309; 90-827; 91-424; 92-462.

A. lividus L. Legado G. Covas. Cultivada en el IFSC bajo el número 89-324; 90-840; 91-436. .-Kew 52.331 cultivada en el IFSC bajo el número 92-419..- Kew 2347, numero de cultivo 92-420. .-Kew 3953, número de cultivo 92-428.

Amaranthus mantegazzianus Passer. cv Don Manuel, Santa Rosa, La Pampa. Legado G. Covas. Cultivada en el IFSC bajo los números 89-302; 89-334; 90-848; 91-421; 92-444; 92-460. .-cv Don Juan. Santa Rosa, La Pampa. cultivo números 89-316; 89-317; 89-337; 92-461. .-Tilcara, Jujuy, legado E. Greizers-tein, cultivo 92-451.

Amaranthus muricatus Gillies ex Moq. Legado G. Covas, cultivado bajo los números 89-324; 990-333; 91-403; 91-453; 92-489. .-San Luis. Legado G. Covas. Cultivado bajo los números 91-402; 92-487; 92-488. .-Bahia Blanca. Legado Villamil. Cultivado bajo los números 91-447; 92-490.

Amaranthus powellii Wats. Legado G. Covas. Cultivado bajo los números 90-877; 91-423; 92-452.

Amaranthus quitensis L. Llavallol, Pcia. Bs. As. EJG 50 Legado E. Greizerstein. Cultivado en el IFSC bajo los números 89-311; 90-860; 91-429; 91-476; 92-497; 92-498. .-Santa Rosa. GC 1012 Legado G. Covas. Cultivado en el IFSC bajo los números 91-430; 91-500; 92-496.

Amaranthus retroflexus L. Kew 27090. Cultivado bajo los números 90-859; 92-511. .-Mexico. Legado G. Covas. Cultivado bajo los números 92-438.

Amaranthus spinosus L. Legado G. Covas. Cultivado bajo los números 89-320; 90-832; 91-437. .-Mexico. Legado G. Covas. Cultivado bajo el número 92-412. .-Mexico. Legado G. Covas. Cultivado bajo el número 92-454.

Amaranthus standleyanus Parodi ex Covas. Santa Rosa, La Pampa. GC 1004. Cultivado bajo los números 89-312; 91-405; 90-824; 90-844; 91-452; 92-435; 92-481. .-Santa Rosa, La Pampa. Legado G. Covas. Cultivado bajo los números 91-404; 92-404; 92-479. .-Santa Rosa, La Pampa GC 1013. Cultivado bajo los números 91-406.

Amaranthus viridis L. Buenos Aires. Legado E. Greizerstein. EJG 59 Cultivado bajo los números 89-304; 90-823; 91-409; 91-458; 92-475; 92-476.- Santa Rosa. La Pampa. Legado G. Covas. Cultivado bajo los números 89-305; 90-822; 91-408; 91-457; 92-447. .-Santa Rosa, La Pampa. Legado G. Covas. Cultivado Bajo el número 91-407; 91-456. .-Bahia Blanca. Legado Villamil CBV 7308. Cultivado bajo los números 91-444; 92-478.

Los ejemplares de herbario serán depositados en el Herbario del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA (BAFC).

1.3. METODOS

1.3.1 Cariotipo y simetría

Todas las observaciones fueron realizadas en células meristemáticas de ápices de raíces provenientes de semillas recién germinadas. Las raíces de aproximadamente 0,5 a 1 cm de longitud fueron pretratadas en colchicina 0.05% durante 2 hs a 20-22°C, en oscuridad. Se probaron otros pretratamientos tales como 8-hidroxiquinoleína 0.02M durante 4 hs, así como también frío (0°C) durante 36 hs pero dado el pequeño tamaño de los cromosomas, sólo el tratamiento con colchicina permitió diferenciar la región del centrómero. Además la cantidad de núcleos detenidos en metafase fue mucho mayor con el tratamiento con colchicina que con los otros tratamientos probados.

La fijación se realizó en alcohol absoluto-ácido acético glacial (3:1) y la tinción se realizó mediante la coloración de Feulgen: se realizó una hidrólisis en HCl 5N durante 40 minutos seguida de un tiempo de tinción de 2hs con el reactivo de Schiff.

En algunos casos se reforzó la coloración mediante el agregado de hematoxilina acética al 2%. Los preparados se hicieron permanentes removiendo el portaobjeto por congelamiento en hielo seco, se deshidrató el preparado en alcohol absoluto y se montó la preparación en Euparal.

La nomenclatura usada para la descripción de la morfología de los cromosomas es la propuesta por Levan *et al.* (1964). De acuerdo con ello, los cromosomas fueron separados en cuatro grupos: cromosomas **m** (Índice Centromérico (IC)= brazo corto x 100/ longitud cromosómica total= 50-37,5), cromosomas **sm** (IC=37,5-25), cromosomas **st** (IC=25-12,5), cromosomas **t** (IC=12,5-0).

En los cariogramas, los miembros del complemento cromosómico han sido agrupados de acuerdo a su morfología, el primer lugar corresponde a los cromosomas **m**, luego los **sm**, los **st** y finalmente los **t**. Dentro de cada grupo los cromosomas fueron ubicados en orden descendente de acuerdo con su longitud total.

Para la estimación de la asimetría cariotípica, se utilizaron dos parámetros numéricos, A_1 y A_2 propuestos por Romero Zarco (1986). El índice de asimetría intracromosómica es $A_1 = 1 - (b_1/B_1)/n$, siendo b_1 y B_1 las longitudes de los brazos cortos y largos, respectivamente, de todos los pares de cromosomas homólogos; n es el número de pares de cromosomas homólogos. El índice A_1 varía de 0 a 1 y tiende a ser 0 cuando los cromosomas tienden a ser metacéntricos, y no depende del número de cromosomas ni del tamaño de los mismos.

El índice A_2 mide la asimetría intercromosómica, debida a la relación entre el largo de los cromosomas y se estima usando el coeficiente de dispersión de Pearson: $A_2 = S/x$, donde S es la desviación standard de la longitud cromosómica total y x es la longitud cromosómica promedio. Debido al uso de S en lugar de la varianza, este índice es independiente del tamaño de los cromosomas y no tiene unidad de medida.

Por medio del uso de estos dos índices y su representación gráfica simultánea en dos coordenadas (Romero Zarco, 1986), se puede realizar una comparación de variaciones numéricas continuas de los diferentes cariotipos. Esto último no era posible con los métodos anteriores, incluyendo la clasificación de Stebbins (1971), por establecer ellos clases fijas que no permiten detectar y comparar pequeños y paulatinos cambios en la evolución del cariotipo.

1.3.2. Microdensitometría

Uno de los métodos más utilizados, además de los métodos químicos, para la determinación del contenido de DNA es la **Microdensitometría**. La medición del contenido de DNA por densitometría se realiza, generalmente mediante nucleos teñidos por el método de Feulgen. Esta reacción fue descrita en 1924 por Feulgen y Rössembeck como específica para el DNA, a partir de investigaciones sobre las aplicaciones de un reactivo desarrollado por Schiff (1866). Al constatar su carácter estequiométrico, éste se tornó el procedimiento citológico más conocido y utilizado para las determinaciones cuantitativas del contenido de DNA. En cuanto a su especificidad, se sabe que si se extrae totalmente el DNA por algún método, la respuesta a la reacción de Feulgen es negativa. También es negativa la respuesta a la presencia de RNA o proteínas.

La reacción de Feulgen involucra dos etapas. Una hidrólisis ácida seguida por la exposición del material hidrolizado al reactivo de Schiff, un leuco derivado de la fucsina básica. La hidrólisis ácida remueve del DNA, preferentemente purinas, desenmascarando la función aldehídica de los azúcares desoxirribosanos a los cuales se hallaban ligados y produciendo un ácido apurínico (Feulgen y Rössembeck, 1924, Di Stephano, 1948, Overend y Stacey, 1949). Los aldehidos así desemascarados pueden reaccionar con el reactivo de Schiff, dando un producto rojizo.

El reactivo de Schiff se obtiene a partir de SO_2 , agua y fucsina básica, este colorante es una mezcla de pararosanilina y seis de sus derivados mono y

dimetil sustituidos en mayor cantidad, rosalinina en menor cantidad y trazas de margenta II (Conn, 1953, Kasten, 1960).

Para que el DNA se pueda depurinizar, es necesario que las uniones entre este compuesto y las proteínas asociadas se rompan. Este paso también es realizado por la hidrólisis ácida.

Factores a tomar en cuenta

a) **influencia de la fijación del material:** la fijación de los nucleos a ser sometidos a la coloración de Feulgen actúa sobre el complejo DNA-proteínas, pudiendo preservar de manera distinta a los diversos componentes protéicos de la misma. De este modo la fijación ejerce influencia sobre el grado con que las purinas se vuelven accesibles a la hidrólisis, así como también sobre la velocidad de disociación de la molécula de ácido apurínico durante la hidrólisis. Por lo tanto la fijación actúa tanto sobre el tiempo necesario de hidrólisis necesaria para la depurinización, como así también sobre la intensidad máxima de coloración posterior (Bauer, 1932, Hillary, 1939, Di Stephano, 1948, Swift, 1955, Deich, 1966, Böhm, 1968, Böhm *et al.*, 1968, Mittermayer *et al.*, 1971, Mello, 1976b, Mello y Zanardi, 1976ab). En cuanto a los fijadores, si diferentes muestras de nucleos de un mismo tipo son fijados en etanol-acético, formol al 10% y metanol-formol-ácido acético (MFA), los valores de unión DNA-Feulgen serán mayores en los nucleos fijados con etanol-acético, seguidos por aquellos fijados en formol al 10% y por último aquellos fijados en MFA (Mello, 1976).

b) **Hidrólisis:** la intensidad de coloración de la reacción de Feulgen varía en función de la concentración y temperatura del ácido utilizado y así también del

tiempo de hidrólisis. La hidrólisis ácida convencional para esta reacción consiste en el uso de HCl 1N a 60 °C. También se ha utilizado HCl en otras concentraciones y a temperaturas más bajas (Fox, 1969). También se han propuesto otros ácidos para la hidrólisis, tales como HClO₄ y TCA (Bloch y Godman, 1955ab). Jordanov (1963) observó que la hidrólisis con HCl 5N a temperatura ambiente produce una coloración de Feulgen más intensa que la obtenida de modo convencional y postuló que la hidrólisis a temperatura ambiente posibilitaría una mayor retención del DNA. De Cosse y Aiello (1966) portularon que la hidrólisis con HCl 5N a temperatura ambiente posibilita una escala más amplia de tiempos de hidrólisis para los cuales se obtiene una coloración máxima.

c) **Temperatura:** Según Kjellstrand (1977), la temperatura de hidrolisis debe ser controlada y conocida dentro de un rango muy estrecho, dado que un aumento de tan sólo 5°C duplica la velocidad de reacción en la hidrólisis.

d) **tiempo de coloración:** Fox (1969) estudió en *Vicia fava* el tiempo mínimo de coloración con el reactivo de Schiff. El observó que la mayor parte del colorante se une en los primeros 15 minutos y que el aumento subsiguiente en la intensidad de la coloración, si bien es leve, es significativo. También Teoh y Rees (1976) en *Picea* y *Allium* observaron que la máxima coloración se alcanza a los 15 minutos y que continúa hasta las 2 horas. Sobre la base de estos resultados el tiempo óptimo de coloración se alcanzaría entre la hora y las dos horas.

e) **tipo de nucleo a medir:** en un estudio microdensitométrico de nucleos con cromatina laxa y condensada, Duijndam y Van Duijn (1975) demuestran que si bien el mecanismo de depurinización del DNA en ambos tipos de nucleos es el

mismo, la velocidad con que ocurre es 2,3 veces menor en los nucleos más compactos que en los más laxos. De allí que para obtener el mismo máximo de absorbancia en los nucleos con cromatina condensada harían falta tiempos más largos de hidrólisis, con la consecuencia de que habría también una mayor despolimerización con pérdida del DNA y por lo tanto, una menor absorbancia. El empleo de nucleos con cromatina muy condensada presenta otra desventaja que puede denominarse **efecto de saturación**. Se refiere a que existe un límite superior de intensidad de coloración detectable, más allá del cual el aumento de contenido de DNA no se refleja en un aumento de la absorbancia. En ambos casos, hay una subestimación del contenido real del DNA, resultando entonces inadecuado el empleo de nucleos con cromatina muy condensada para la cuantificación del DNA.

f) estado del ciclo mitótico de los nucleos a medir: la medición del contenido 2C de DNA se debe realizar en nucleos mitóticos en anafase-telofase teniendo en cuenta los criterios de contracción de la cromatina del apartado anterior. La medición en nucleos interfásicos, que se encuentran en mayor cantidad tiene el inconveniente de que es dificultoso precisar si se encuentran en fase G1 (2C), S (2C a 4C) o G2 (4C).

g) necesidad de un estándar interno: con el transcurso del tiempo se produce un decaimiento de la coloración y por ello es aconsejable realizar las mediciones lo más rápidamente posible. Sin embargo, el empleo de un testigo o estándar interno permite salvar este inconveniente. Asimismo, a fin de poder comparar los resultados obtenidos en diferentes preparados de diferentes individuos o especies, o en diferentes oportunidades, es indispensable el empleo

de un estándar interno al cual se refieran las absorbancias medidas. Por lo general se emplea un testigo cuyo contenido absoluto de DNA (generalmente expresado en picogramos (10^{-12} gramos) o unidades equivalentes (pares de bases o dáltons) se conoce por métodos bioquímicos. A partir de las absorbancias relativas de los nucleos del material en estudio y del testigo, es posible transformar los datos de absorbancia en unidades absolutas. Como teóricamente la intensidad de coloración del testigo decae de manera similar a la del material en estudio, es posible hacer comparables todos los resultados obtenidos. Un estándar interno aconsejable es *Allium cepa* cuyo contenido 2C de DNA es 33.5pg. (Bennett y Smith, 1976)

c) **curva de hidrólisis:** Durante la hidrólisis ácida el número de ácidos apurínicos de las moléculas de DNA que pueden reaccionar aumenta hasta un máximo y luego desciende debido a que la despolimerización del ácido apurínico provoca que se pierdan grupos aldehído que deben unirse a las moléculas del reactivo de Schiff. La cinética de la reacción puede ser estudiada en solución o in situ midiendo los valores de absorbancia del complejo Feulgen-DNA para diferentes tiempos de hidrólisis y construyendo la **curva de hidrólisis**. En ésta, la porción ascendente corresponde a la eliminación gradual de purinas del DNA, mientras que la porción descendente de la curva corresponde a la remoción de pirimidinas, desoxirribosa y depolimerización y solubilización del ácido apurínico (Mello y de Vidal, 1978).

En el presente trabajo el contenido de DNA fue medido en nucleos 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) por 1-4 días. Las raíces fijadas fueron lavadas en agua destilada durante 30 minutos (3 x 10 minutos cada uno). La hidrólisis fue realizada con HCl 5N a 20°C. Para la determinación del tiempo óptimo de hidrólisis se construyó una curva de hidrólisis realizándose varias hidrólisis cuya duración varió entre los 20 a los 90 minutos con intervalos de 10 minutos entre cada una de ellas. Se determinó a partir de dicha curva que el tiempo óptimo fue de 40 minutos. Luego de la hidrólisis las raíces se lavaron tres veces en agua destilada durante periodos de 10-15 minutos cada uno. La tinción con el reactivo de Schiff pH 2.2 (Teoh y Rees, 1976) se realizó durante dos horas a 20°C en oscuridad. El material coloreado fue luego lavado en agua sulfurosa (CIH 1, 5N+ 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 DNA. Los preparados fueron realizados por aplastado en una gota de ácido acético glacial 45%. Luego se removió el cubreobjeto mediante congelación con hielo seco, se deshidrató con alcohol absoluto y luego se montaron los preparados en euparal. La intensidad de la absorbancia del colorante de Feulgen por núcleo, expresada en unidades arbitrarias, fue medida a una longitud de onda de 570nm, usando el método de barrido con un Microespectrofotómetro Zeiss Universal (UMSP 30). El contenido de DNA por genoma básico, expresado en picogramos fue primeramente calculado utilizando *Allium cepa* como standard (2C= 33.55pg, Bennett y Smith, 1976) y luego *Amaranthus cruentus* cv. Don Giem (2C= 1,26 pg) ya que al ser del mismo orden el contenido de DNA, los errores debidos al método se

minimizan. Las diferencias en contenido de DNA fueron analizadas por análisis de la varianza y para las comparaciones entre medias se utilizó el método de Scheffe.

La transformación de los datos de unidades arbitrarias a picogramos se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de DNA (pg)} = \frac{\text{Absorbancia del nucleo medido} \times (1,26)}{\text{Absorbancia promedio del estándar interno}}$$

donde 1,26 es el contenido de DNA de *Amaranthus cruentus*, que se usó como standard interno.

1.3.3. Bando C

La identificación de las regiones heterocromáticas se realizó por medio del bando C. Esta técnica constituye una manera sumamente útil y sencilla de identificar, localizar y cuantificar regiones de heterocromatina constitutiva en un complemento cromosómico, si bien tiene limitaciones que se señalarán más adelante.

La técnica del Bando C se basa en la extracción selectiva del DNA de los cromosomas, mientras que una gran proporción del DNA queda retenida en las bandas C+. La distribución diferencial del DNA puede ser luego revelada por la tinción con Giemsa.

La técnica debe ser realizada en cromosomas fijados en una mezcla de alcohol (etílico o metílico) y ácido acético glacial en una proporción 3:1. La fijación remueve una fracción sustancial de las histonas de los cromosomas

(Brody, 1974; Sivak y Wolman, 1974; Ritief y Ruchel, 1977). Juntamente con las histonas también son removidas algunas proteínas no histónicas, las cuales no han sido aún caracterizadas. En contraste con las proteínas, el DNA prácticamente no es removido durante la fijación (Sivak y Wolman, 1974).

El tratamiento con CIH diluido depurina al DNA sin romper el esqueleto del DNA y permite que el DNA extraído se solubilice.

El álcali ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) actuaría produciendo un alto nivel de desnaturalización del DNA que facilita la posterior disolución del DNA.

La incubación con la solución salina concentrada produce una nueva extracción diferencial del DNA.

El colorante Giemsa es un complejo de colorantes con varios grados de oxidación. Básicamente consiste en metilén blue, Azure A, Azure C y tionina y Eosina. Las cuatro primeras representan grupos tiosina los cuales reaccionan con los grupos fosfato del DNA.

Los mecanismos moleculares de las extracciones diferenciales de DNA realizadas por cada paso de la técnica permanecen aún poco claras. Sin embargo se cree que algún tipo de interacción DNA-proteínas esté involucrado.

King y John (1980) han señalado que cuando se analizan los resultados obtenidos mediante la técnica del bandeo cromosómico C es preciso tener en cuenta ciertas limitaciones de la técnica. Por un lado, la condensación cromosómica puede llevar a la pérdida de resolución de bandas finas o a la fusión de bandas asociadas íntimamente (Ray y Venkeshwaran, 1978). Esto se podría minimizar observando cromosomas más elongados. Por otro lado los resultados no son comparables en algunos casos pues se requieren tratamientos

distintos para la obtención de resultados positivos en distintas especies e incluso diferentes tratamientos en la misma especie pueden llevar a diferencias pronunciadas en el número y posición de las bandas obtenidas (John y King, 1983; Schmid, 1978; Schnedl y Czaker, 1974). Para minimizar estas limitaciones de la técnica es preciso mantener constantes, dentro de lo posible, las condiciones bajo las cuales se aplica la técnica y también analizar las bandas en células que se encuentren con los cromosomas en el mismo grado de condensación. De todas maneras, teniendo en cuenta las consideraciones mencionadas, la técnica del bandeo cromosómico C constituye una de las herramientas citogenéticas más empleadas y de mejores resultados en estudios citotaxonómicos y evolutivos, particularmente en plantas e insectos, en donde las técnicas de bandeo cromosómico G no han resultado factibles o bien los resultados obtenidos hasta el presente no justifican su utilización.

La técnica de Bando C, utilizando Giemsa como colorante fue realizada de acuerdo a la técnica propuesta por Giráldez *et al.* (1979) con las modificaciones debidas a las particularidades del material analizado. Las raíces de semillas recién germinadas fueron cortadas cuando su longitud alcanzó 1 cm y pretratadas con colchicina 0,05% durante 2 hs. a temperatura ambiente en oscuridad y luego fueron fijadas en alcohol absoluto-ácido acético glacial (3:1) y guardadas en el fijador a 5 °C durante no más de una semana. Una conservación de más tiempo conlleva a que el citoplasma de las células se endurezca y dificulte la realización de los preparados. Para la elaboración de los preparados se utilizaron dos métodos con idénticos resultados: el primero fue macerar, las raíces fijadas en ácido acético glacial 60% a temperatura ambiente, durante 30

minutos antes de realizar el aplastado, el segundo fue hacer una digestión de las paredes celulares con una mezcla de celulasa-pectinasa al 50% en buffer Acido Cítrico-Citrato de Sodio 0,01M a pH 4,5 durante 15 minutos a temperatura ambiente. El aplastado fue realizado en una gota de ácido acético glacial 45%, eliminando el citoplasma por calentamiento directo en llama suave y controlando la existencia de división por contraste de fase.

El cubre objeto fue removido por congelamiento en hielo seco y los preparados se deshidrataron y envejecieron en un Koplín con alcohol absoluto durante una semana. Luego el material fue hidrolizado en HCl 0,2N a 60 °C durante 3 min. y lavado en agua destilada. Los preparados fueron sumergidos en una solución saturada de $(OH)_2Ba$ (6 gr./100 ml) durante 20 min. a temperatura ambiente, cuidando que no se forme una película insoluble de CO_3Ba la cual cambia el pH de la solución. El material fue enérgicamente lavado en agua corriente e incubado en 2xSSC (Solución Salina Concentrada) (ClNa (Cloruro de Sodio) 17,5gr.+ $C_6H_5O_7Na \cdot 2H_2O$ (Citrato de Sodio) 8,8gr.+ H_2O dest. 1l) a 60 °C durante 1 hr. Los preparados, luego de ser lavados en agua destilada, fueron teñidos en una solución de Giemsa al 2% en buffer Sorensen (PO_4H_2K (Fosfato Monobásico de Potasio) 5,26gr + PO_4HNa_2 (Fosfato dibásico de Sodio) 8,65gr + H_2O dest. 1l)pH 6,8. El control de la coloración se hizo bajo microscopio. Los preparados teñidos fueron secados en corriente de aire caliente y lavados en Xilol. El montaje de los mismos se hizo en Depex.

1.4. RESULTADOS

1.4.1. Número cromosómico somático, Morfología y Simetría

En la Tabla 2 se indican los números cromosómicos somáticos de las especies estudiadas en el presente trabajo.

En las figuras 7, 9, 11 y 12 se muestran las metafases mitóticas de los materiales estudiados.

Las especies *A. albus* (Fig. 11A), *A. bouchonii* (Fig. 9A), *A. caudatus* (Fig. 7C), *A. hybridus* (Fig. 9B), *A. hypochondriacus* (Fig. 7B), *A. mantegazzianus* (Fig. 7A) y *A. quitensis* (Fig. 9C) presentaron 32 cromosomas en todas las células estudiadas.

Por su parte las especies *A. cruentus* (Fig. 7D), *A. deflexus* (Fig. 12C), *A. lividus* (Fig. 11C), *A. muricatus* (Fig. 12A), *A. powellii* (Fig. 9D), *A. retroflexus* (Fig. 11D), *A. spinosus* (Fig. 9E), *A. standleyanus* (Fig. 11B) y *A. viridis* (Fig. 12B) presentaron 34 cromosomas somáticos.

Por último *A. dubius* fue la única especie con un número cromosómico somático de 64 cromosomas (Fig. 12D)

Las fórmulas cariotípicas y los índices de asimetría de *A. bouchonii* ($2n=32$), *A. caudatus* ($2n=32$), *A. cruentus* ($2n=34$), *A. hybridus* ($2n=32$), *A. hypochondriacus* ($2n=32$), *A. mantegazzianus* ($2n=32$), *A. powellii* ($2n=34$), *A. quitensis* ($2n=32$) y *A. spinosus* ($2n=34$) están indicados en las figuras 8 y 10 y en la Tabla 3. Las especies estudiadas difieren en sus fórmulas cariotípicas y muestran leves diferencias en sus índices de asimetría A_1 y A_2 (Fig. 14, Tabla 3).

En las especies en las que fue posible determinarlo se encontró hasta un par de cromosomas con un satélite conspicuo (Fig.7D). Dado el pequeño tamaño de los cromosomas (cerca de $1\mu\text{m}$) se hace difícil identificar, con precisión en todas las especies, el par cromosómico que posee la constricción secundaria.

En los casos en que fue posible estudiar más de una procedencia de una especie, los cariotipos obtenidos fueron muy semejantes entre procedencias.

1.4.2. Contenido de DNA

Se midió el contenido de DNA total (2C) de las siguientes especies: *A. bouchonii*, *A. caudatus*, *A. cruentus*, *A. dubius*, *A. hybridus*, *A. hypochondriacus*, *A. mantegazzianus*, *A. powellii* y *A. quitensis*.

Para determinar el tiempo óptimo de tratamiento con CIH 5N, se realizó en primer lugar la curva de hidrólisis y se determinó que el tiempo mínimo óptimo de hidrólisis fue de 40 minutos. Este tiempo de hidrólisis fue utilizado en todas las mediciones que se realizaron en el presente trabajo.

En la Tabla 4 se indica el número cromosómico, el número de núcleos estudiados y el contenido de DNA (2C) total y de contenido de DNA por genoma básico. Este último dato sirve para poder comparar el contenido total de DNA por genoma en especies con diferente nivel de ploidía. También nos permite analizar el DNA genómico entre especies con distinto número cromosómico ($2n=32$ y $2n=34$). Para cada especie se estudiaron al menos dos poblaciones y de 2 a 4 individuos de cada una. Para cada individuo se midieron por lo menos 15 células en núcleos anafásicos-telofásicos. Los datos obtenidos en unidades

arbitrarias fueron convertidos a picogramos utilizando, en las primeras mediciones a *Allium cepa* (33.55 pg) como testigo. Debido a que las diferencias en contenido de DNA entre *Allium* y *Amaranthus* eran muy grandes, se calibró el contenido de DNA en picogramos en *A. cruentus* cv Dom Giem (1,26 pg) y luego se utilizó esta especie como testigo interno. Se eligió esta especie y dentro de ella a este cultivar debido a que es un material proveniente de una línea pura, bajo cultivo prolongado y del cual se poseían muchas semillas.

Se realizó un ANOVA entre individuos de cada población y dentro de cada especie. Dado que las diferencias fueron no significativas dentro y entre poblaciones, los datos correspondientes a cada especie se consideraron como una sola muestra promediándose los resultados. Como las mediciones se realizaron en dos períodos distintos, se consideró a cada uno de ellos como ensayos distintos. También se utilizó *A. mantegazzianus* como testigo interno para poder comparar los resultados de ambos ensayos.

El análisis de la varianza determinó que en el primer ensayo (Tabla 5) existen diferencias significativas en el contenido de DNA total entre las especies estudiadas ($F = 36,348$). Los contrastes realizados mediante el test de Scheffe ($F_{3,269} = 2,64$ $P > 0,001$), mostraron que entre *A. mantegazzianus* (1,46 pg) y *A. caudatus* (1,35 pg) existen diferencias significativas y a su vez, ambas especies difieren significativamente de *A. cruentus* (1,26 pg) y de *A. hypochondriacus* (1,26 pg). Entre estas dos últimas especies no existen diferencias significativas en contenido de DNA total (2C).

El segundo ensayo comprendió a las especies *A. bouchonii* (2n=32); *A. dubius* (2n=64); *A. hybridus* (2n=32); *A. mantegazzianus* (2n=32); *A. powelli*

($2n=34$), *A. quitensis* ($2n=32$) y *A. spinosus* ($2n=34$). Para determinar la existencia de diferencias significativas en el contenido de DNA, y con el objeto de poder comparar el genoma de *A. dubius*, los estadísticos fueron realizados utilizando los valores por complemento haploide. El análisis estadístico de los datos obtenidos mostró la existencia de diferencias significativas entre las especies estudiadas. ($F_{5,134} = 51,9573$ $P > 0,001$) (Tabla 6). En este ensayo las comparaciones de medias se realizaron mediante contrastes de Scheffé y los resultados fueron los siguientes: *A. mantegazzianus* y *A. bouchonii* no mostraron diferencias significativas en contenido de DNA entre ellas, pero sí con todas las demás especies analizadas. Por su parte *A. quitensis*, *A. hybridus* y *A. powelli*, las especies con menor contenido de DNA, no presentaron diferencias significativas en sus contenido de DNA. *A. dubius* es la especie con mayor contenido de DNA total. Sin embargo al compararla en el mismo nivel de ploidía que el resto de las especies, presentó el menor contenido de DNA por complemento haploide. Este valor no resultó estadísticamente significativo cuando fue comparado con *A. quitensis* pero sí lo fue cuando fue comparado con las otras especies del grupo de menor contenido de DNA (Tabla 6). Por último se midió a *A. spinosus* (Tabla 4) y se la comparó con *A. cruentus*. Entre ambas especies no se observaron diferencias significativas

1.4.3.Heterocromatina

Se realizaron estudios para determinar si las diferencias en contenido de DNA de las especies estudiadas estaban relacionadas con diferencias en la presencia de heterocromatina constitutiva.

La técnica del bandeo cromosómico C mostró que *A. mantegazzianus*, *A. caudatus* y *A. bouchonii* presentaron bandas C+ en la mayoría de los cromosomas del complemento (Fig.13A,C,F). Por el contrario, en *A. cruentus*, *A. hypochondriacus*, *A. hybridus*, *A. quitensis* y *A. powelli*, sólo unos pocos cromosomas mostraron la presencia de bandas C+ (Fig. 13B,D,E). Debido al pequeño tamaño de los cromosomas de *Amaranthus* no fue posible realizar los cariotipos bandeados, determinar con precisión la cantidad de cromosomas que mostraron bloques heterocromáticos o realizar un cálculo preciso del porcentaje de heterocromatina con respecto al genoma completo. Pero los dos grupos de especies mencionadas presentan grandes diferencias entre ellas en número de bandas presentes. Estos grupos están formados, en general, por especies que presentaron alto y bajo contenido de DNA respectivamente.

Tabla 2: Números cromosómicos y viabilidad del polen de las especies estudiadas en el presente trabajo

Especie	n	2n	viabilidad de polen (%)
<i>A. albus</i>	16	32	95
<i>A. bouchonii</i>	16	32	96
<i>A. caudatus</i>	16	32	98
<i>A. crispus</i>	16		96
<i>A. cruentus</i>	17	34	92
<i>A. deflexus</i>	17	34	97
<i>A. dubius</i>	32	64	92
<i>A. hybridus</i>	16	32	95
<i>A. hypochondriacus</i>	16	32	96
<i>A. lividus</i>	17	34	94
<i>A. mantegazzianus</i>	16	32	96
<i>A. muricatus</i>	17	34	95
<i>A. powellii</i>	17	34	98
<i>A. quitensis</i>	16	32	90
<i>A. retroflexus</i>	17	34	97
<i>A. spinosus</i>	17	34	95
<i>A. standleyanus</i>	17	34	95
<i>A. viridis</i>	17	34	94

Tabla 3: Fórmulas cariotípicas e índices de asimetría de las especies estudiadas

Especie	2n	FORMULA CARIOTIPICA	A1	A2
<i>A. bouchonii</i>	32	5m+4sm+2st+5t	0,5820	0,2634
<i>A. caudatus</i>	32	5m+3sm+8t	0,6135	0,2491
<i>A. cruentus</i>	34	3m+7sm+7t	0,6983	0,2222
<i>A. hybridus</i>	32	5m+2sm+1st+8t	0,6110	0,3595
<i>A. hypochondriacus</i>	32	5m+4sm+1st+6t	0,5958	0,2353
<i>A. mantegazzianus</i>	32	5m+2sm+8t	0,6126	0,3701
<i>A. powellii</i>	34	5m+2sm+2st+8t	0,7070	0,2504
<i>A. quitensis</i>	32	5m+1sm+10t	0,7240	0,3087
<i>A. spinosus</i>	34	4m+2sm+1st+10t	0,7059	0,2696

Tabla 4: Contenido de DNA total 2C y por "genoma básico" de las especies estudiadas

Especie	2n	x	Numero Células (repeticiones)	Contenido DNA total (pg) 2C	Contenido DNA por Complemento haploide (pg)
<i>A. bouchonii</i>	32	2	56(3)	1,61±0,014	0,805
<i>A. caudatus</i>	32	2	98(7)	1,35±0,013	0,658
<i>A. cruentus</i>	34	2	65(10)	1,26±0,013	0,630
<i>A. dubius</i>	64	4	80(4)	2,10±0,015	0,525
<i>A. hybridus</i>	32	2	50(3)	1,28±0,014	0,641
<i>A. hypochondriacus</i>	32	2	35(7)	1,26±0,018	0,630
<i>A. mantegazzianus</i>	32	2	75(8)	1,46±0,015	0,730
<i>A. powelli</i>	34	2	45(2)	1,25±0,018	0,627
<i>A. quitensis</i>	32	2	80(8)	1,24±0,015	0,620
<i>A. spinosus</i>	34	2	35(2)	1,25±0,012	0,627

Tabla 5: Resultados de los análisis estadísticos del Ensayo 1

Tabla de ANOVA

	GL	S.C.	CM	F
Entre especies	3	1,693	0,564	36,348
Error	269	4,176	0,0155	
Total	272	5,869		

Contrastes por el Método de Scheffé ($F_{3,268} = 2,64$)

Comparaciones	Estadístico	Significancia
<i>A. cruentus</i> vs <i>A. caudatus</i>	4,236	S
<i>A. cruentus</i> vs <i>A. mantegazzianus</i>	9,435	S
<i>A. cruentus</i> vs <i>A. hypochondriacus</i>	0,052	NS
<i>A. caudatus</i> vs <i>A. mantegazzianus</i>	6,005	S
<i>A. caudatus</i> vs <i>A. hypochondriacus</i>	3,386	S
<i>A. mantegazzianus</i> vs <i>A. hypochondriacus</i>	7,757	S

S=diferencias significativas; NS= diferencias no significativas

Tabla 6: Resultados de los análisis estadísticos del Ensayo 2

Tabla de ANOVA

	GL	S.C.	CM	F
Entre especies	5	1,110	0,222	51,9573
Error	129	0,551	4,273	
Total	134	1,661		

Contrastes por el Método de Scheffé ($F_{5,129} = 3,383785$)

Comparaciones		Estadístico	Significancia
<i>A. mantegazzianus</i>	vs. <i>A. quitensis</i>	10,122	S
<i>A. mantegazzianus</i>	vs. <i>A. hybridus</i>	6,581	S
<i>A. mantegazzianus</i>	vs. <i>A. bouchonii</i>	2,260	NS
<i>A. mantegazzianus</i>	vs. <i>A. dubius</i>	12,355	S
<i>A. mantegazzianus</i>	vs. <i>A. powelli</i>	6,843	S
<i>A. quitensis</i>	vs. <i>A. hybridus</i>	3,277	NS
<i>A. quitensis</i>	vs. <i>A. bouchonii</i>	9,898	S
<i>A. quitensis</i>	vs. <i>A. dubius</i>	2,859	NS
<i>A. quitensis</i>	vs. <i>A. powelli</i>	2,153	NS
<i>A. hybridus</i>	vs. <i>A. bouchonii</i>	7,187	S
<i>A. hybridus</i>	vs. <i>A. dubius</i>	5,905	S
<i>A. hybridus</i>	vs. <i>A. powelli</i>	0,845	NS
<i>A. bouchonii</i>	vs. <i>A. dubius</i>	11,821	S
<i>A. bouchonii</i>	vs. <i>A. powelli</i>	7,470	S
<i>A. dubius</i>	vs. <i>A. powelli</i>	4,669	S

S=diferencias significativas; NS= diferencias no significativas

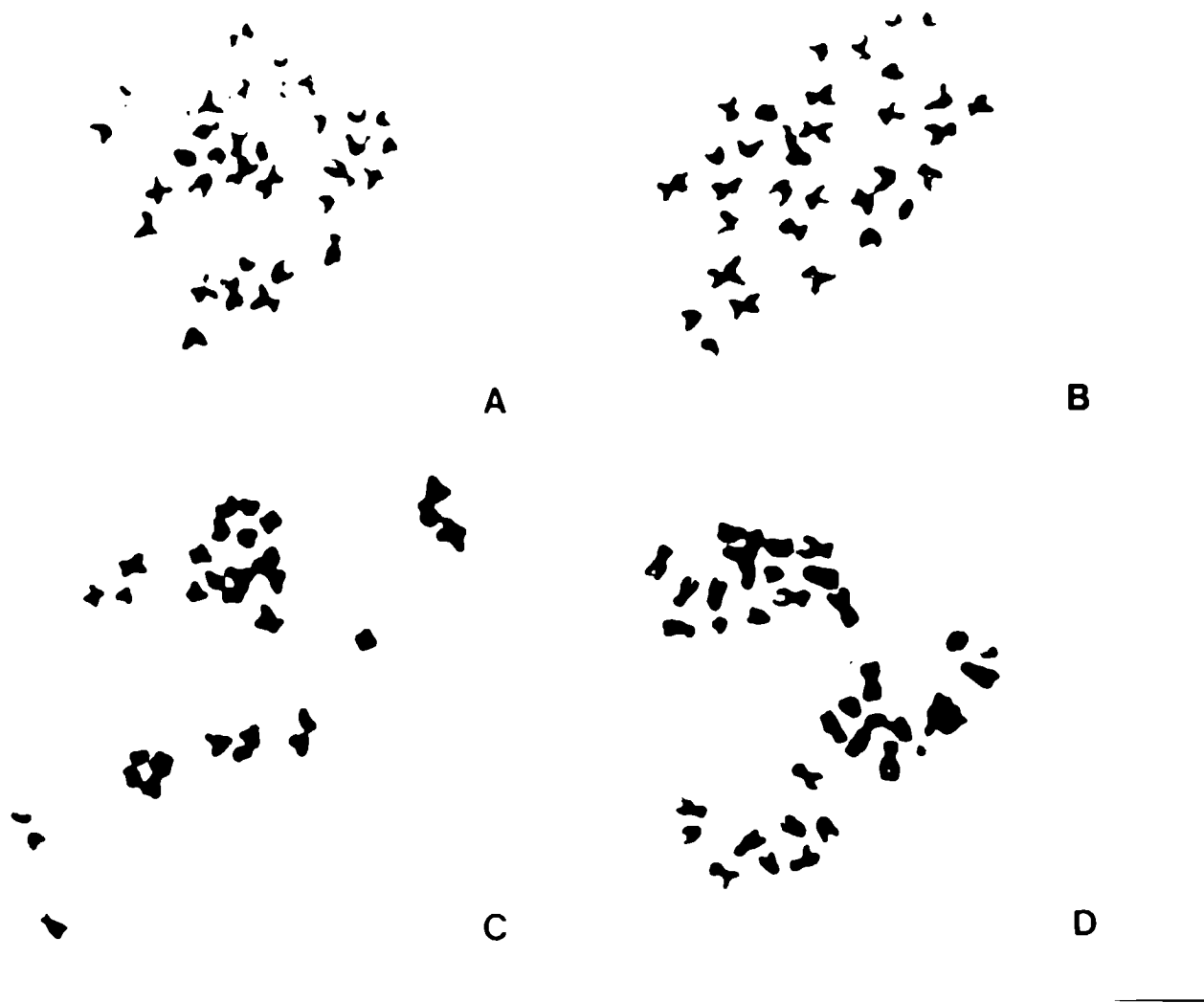
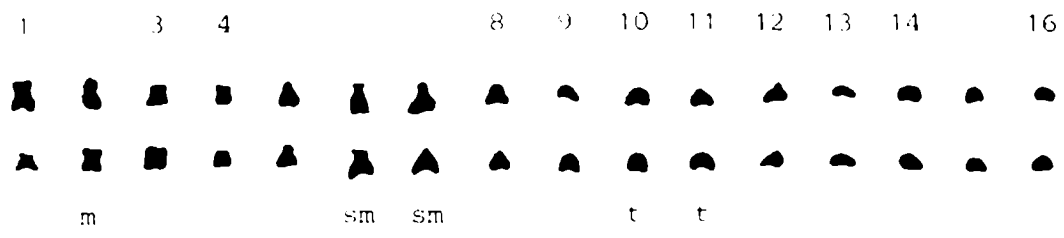
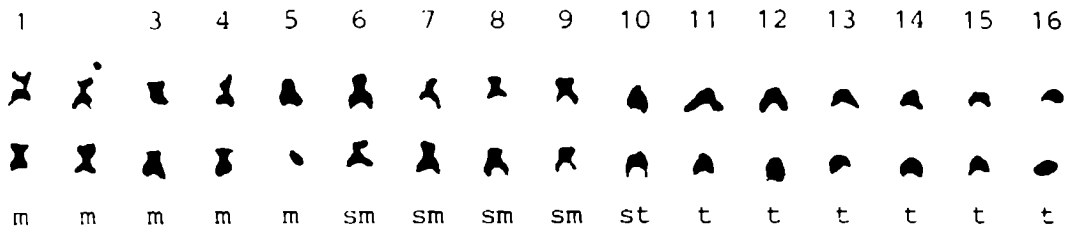


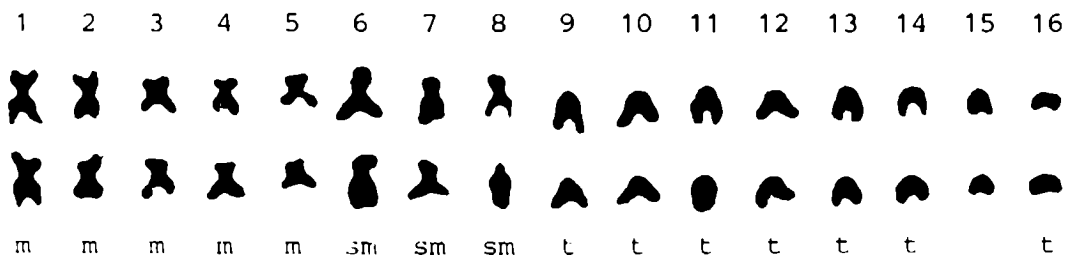
Figura 7. A-D Metafases mitóticas que fueron utilizadas para la confección de los cariotipos de la figura 4. A=A. mantegazzianus ($2n=32$); B=A. hypochondriacus ($2n=32$); C=A. caudatus ($2n=32$); D=A. cruentus ($2n=34$). La barra indica $10\mu\text{m}$. Todas con el mismo aumento.



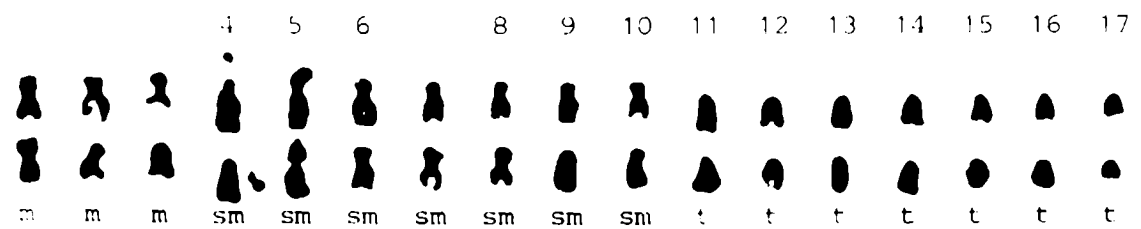
A. caudatus



A. hypochondriacus



A. mantegazzianus



A. cruentus

Figura 8: Cariogramas de las cuatro especies graníferas del género. La barra indica 10µm. Todas con el mismo aumento.

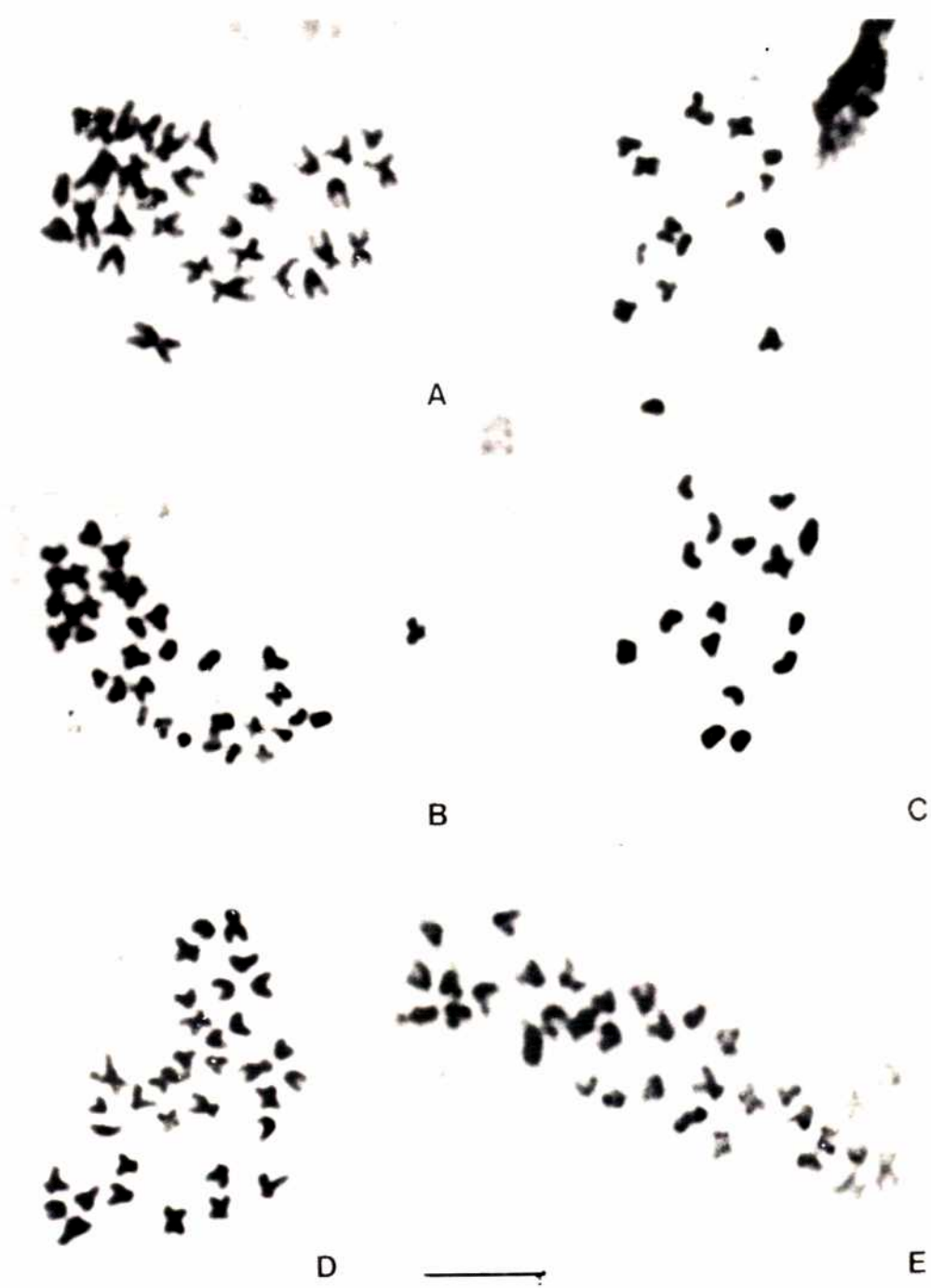


Figura 9. A-E Metafases mitóticas que fueron utilizadas para la confección de los cariotipos de la figura 6. A=A. bouchonii (2n=32); B=A. hybridus (2n=32) C=A. quitenis (2n=32); D=A. powellii (2n=34); E=A. spinosus (2n=34). La barra indica 5µm. Todas con el mismo aumento.

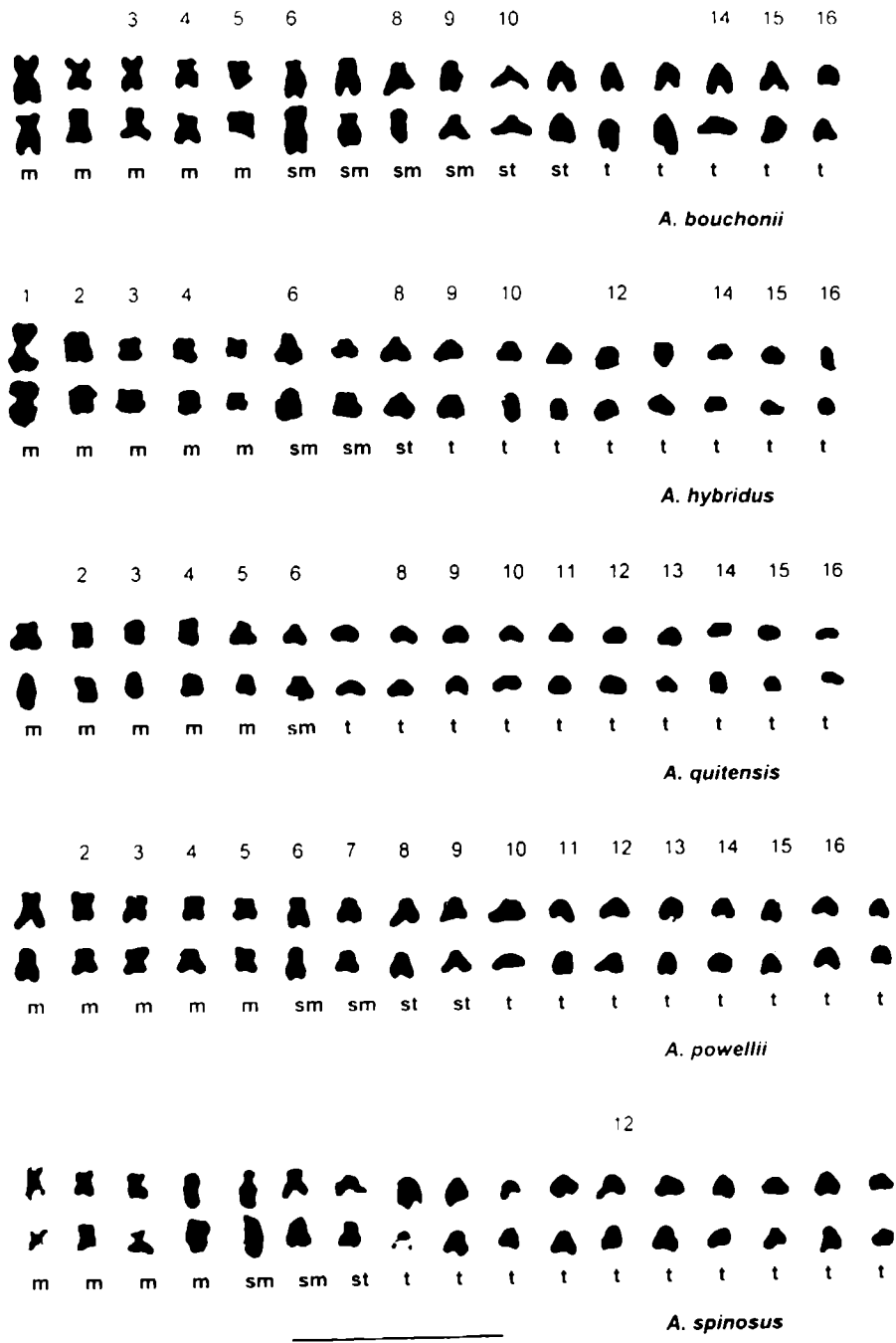


Figura 10. Cariogramas de las posibles especies progenitoras de los amarantos graníferos. La barra indica 5µm. Todas con el mismo aumento.

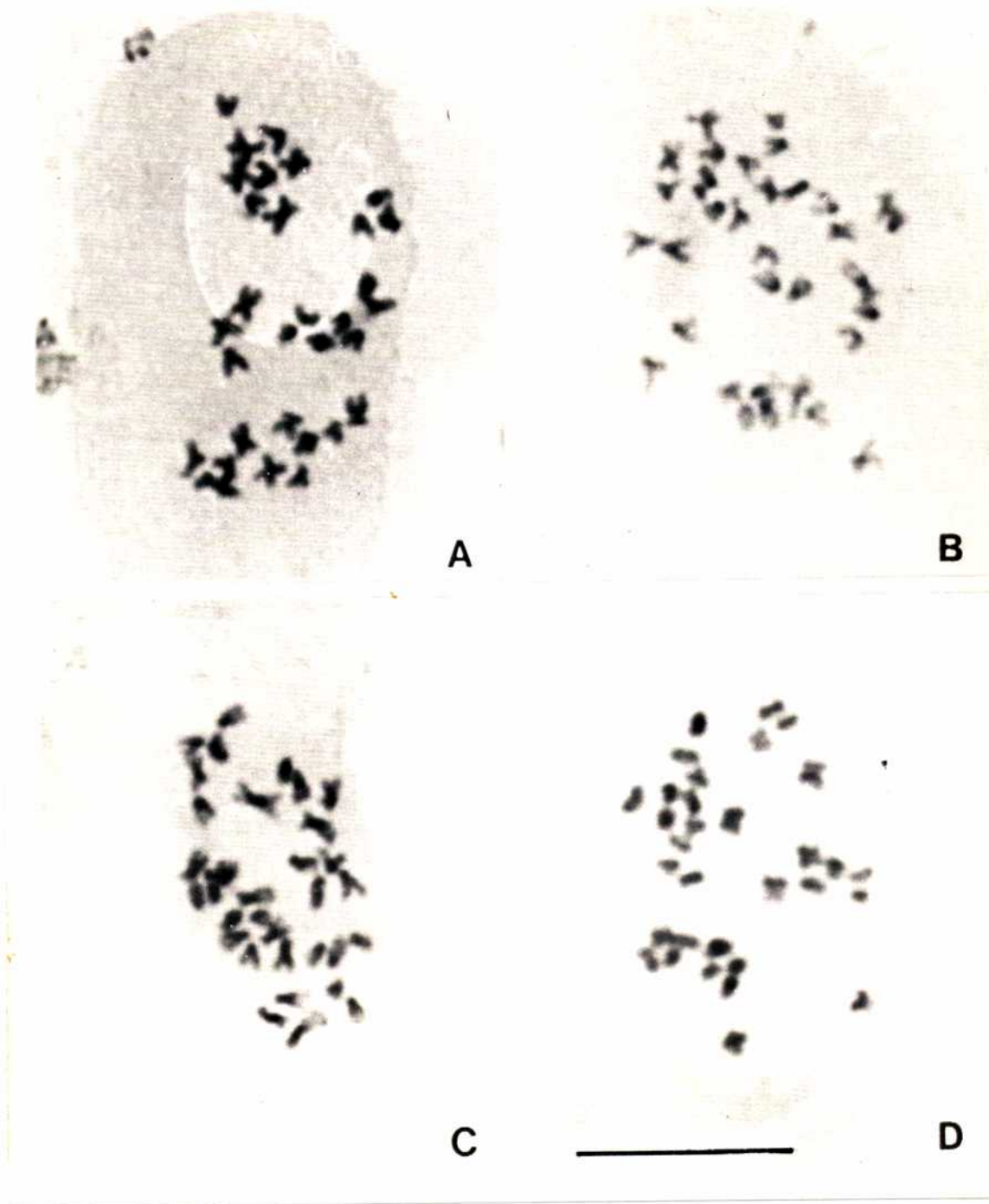


Figura 11. Metafases mitóticas de algunas especies silvestres
A= *A. albus* ($2n=32$); B=*A. standleyanus* ($2n=34$); C= *A. lividus* ($2n=34$); D= *A. retroflexus* ($2n=34$). La barra indica $5\mu\text{m}$. Todas con el mismo aumento.

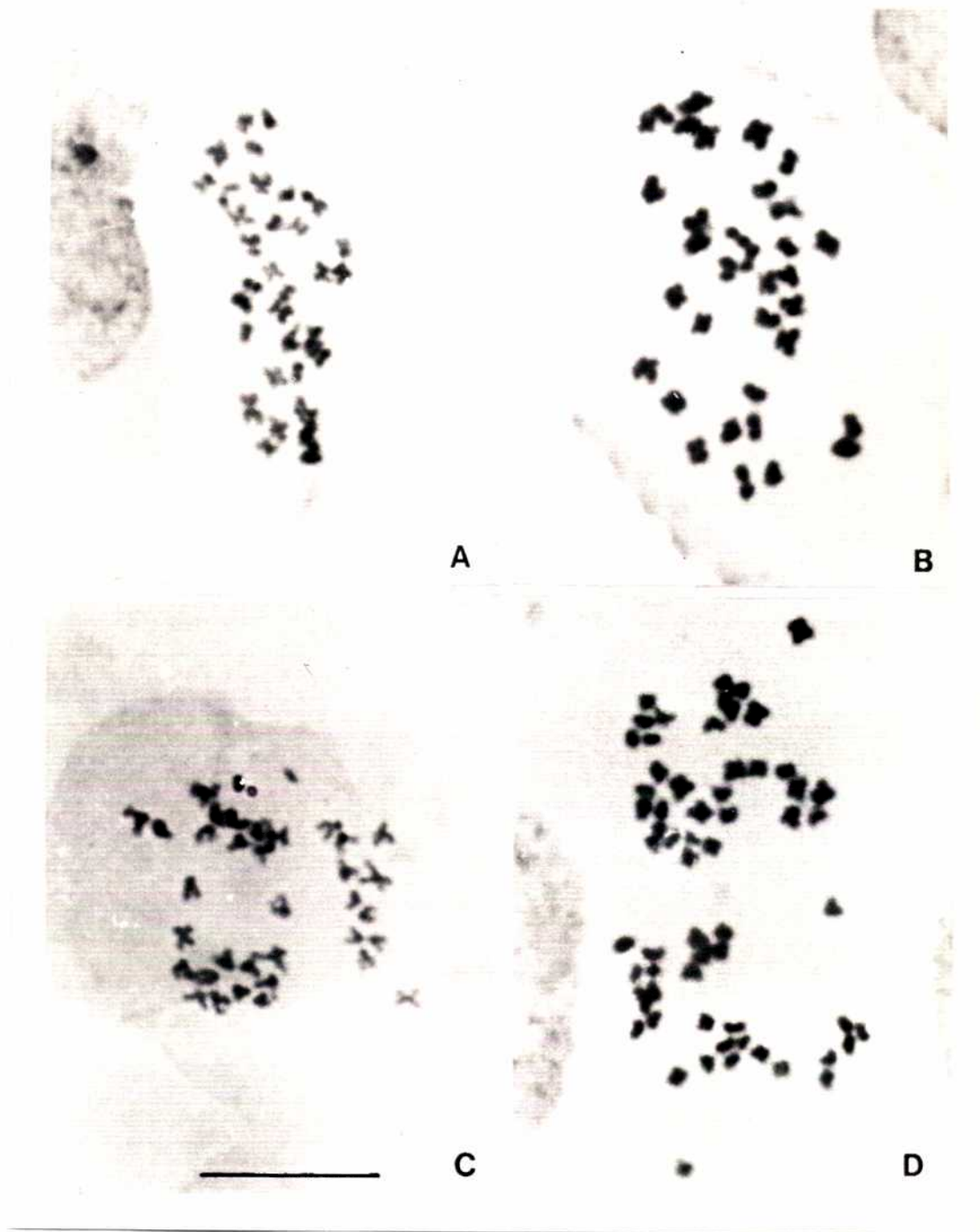


Figura 12. Metafases mitóticas de algunas especies silvestres
A= *A. muricatus* ($2n=34$); B= *A. viridis* ($2n=34$); C= *A. deflexus* ($2n=34$); D= *A. dubius* ($2n=64$). La barra indica $5\mu\text{m}$. Todas con el mismo aumento.

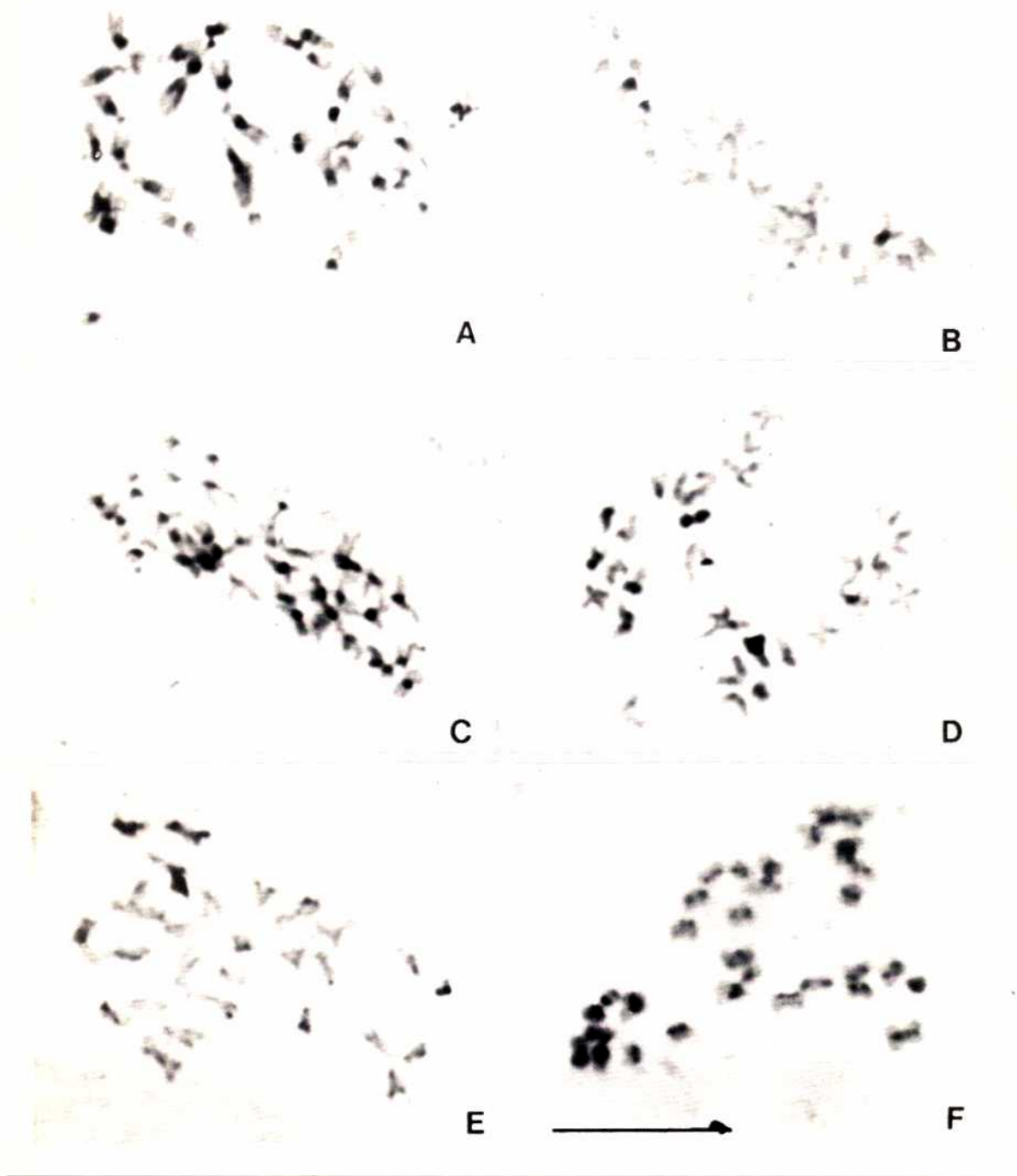


Figura 13. Bando C de algunas especies del género.

A=A. caudatus; B= A. cruentus; C= A. mantegazzianus; D=A. hypochondriacus; E= A. hybridus; F= A. bouchonii. La barra indica 5 μ m. Todas con el mismo aumento.

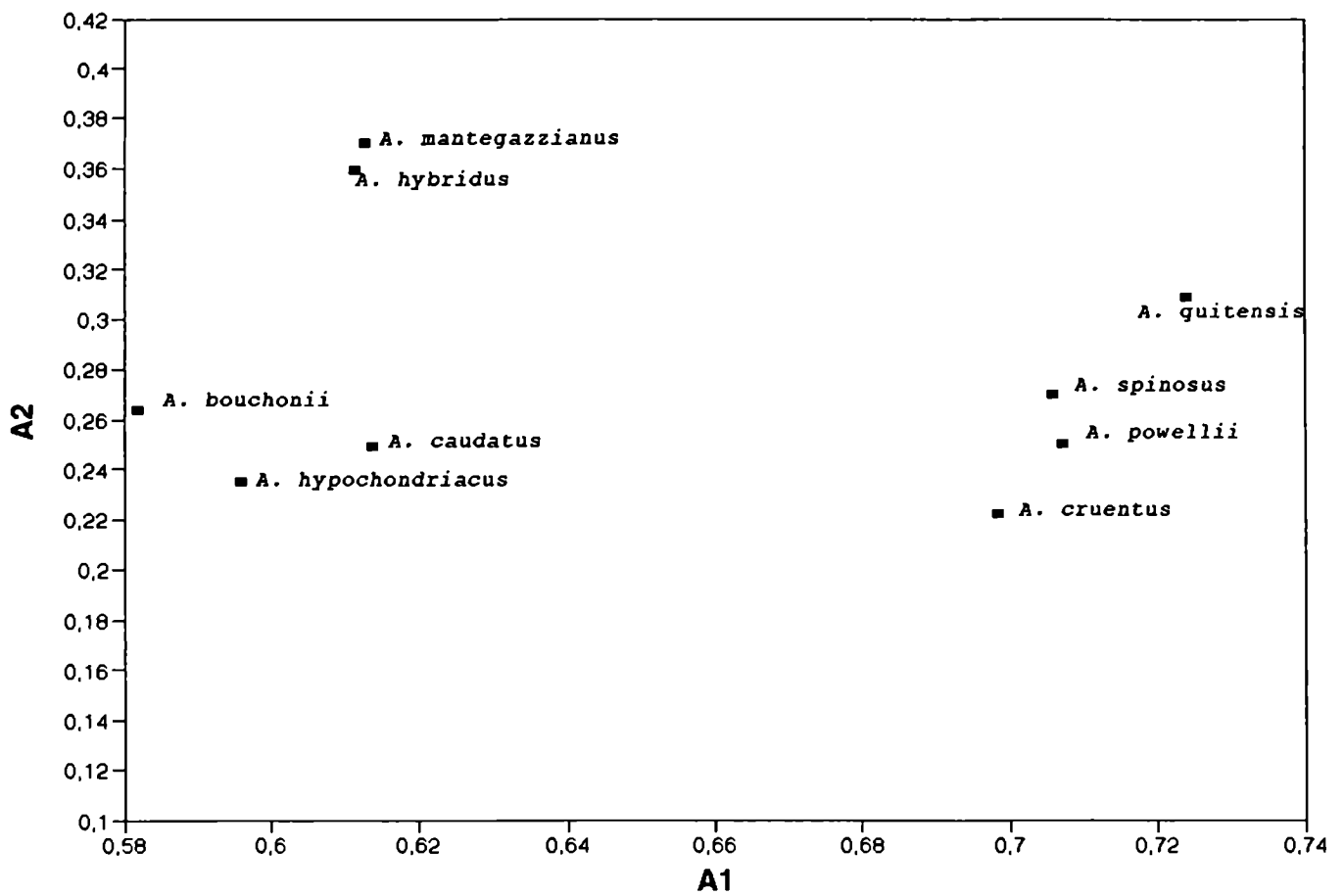


Figura 14: Diagrama de dispersión que representa la asimetría debida a la relación entre brazos cromosómicos (A1) y la debida a la variación entre la longitud de los cromosomas (A2).

1.5. DISCUSION

1.5.1. Morfología y simetría

Para el género *Amaranthus* se han descrito, en general, dos números cromosómicos somáticos: $2n=32$ y $2n=34$ y, en algunos casos, ambos números han sido citados para la misma especie. *A. dubius* es la única especie con $2n=64$ cromosomas (Tabla 1).

En el presente trabajo se confirman los números cromosómicos somáticos de las especies *A. albus*, *A. bouchonii*, *A. caudatus*, *A. cruentus*, *A. deflexus*, *A. dubius*, *A. hybridus*, *A. hypochondriacus*, *A. lividus*, *A. mantegazzianus*, *A. muricatus*, *A. powellii*, *A. quitensis*, *A. retroflexus*, *A. spinosus* y *A. viridis*

Debido a que Grant (1959) sugirió que en amarantos "el pequeño tamaño de los cromosomas ha hecho que no sea práctico el estudio detallado de los cromosomas y además no existen diferencias en el tamaño absoluto de los mismos entre las especies del género" no existen al presente muchos trabajos en los cuales, además de citar el número cromosómico, se haga una descripción del cariotipo de las especies estudiadas. Sin embargo, los resultados obtenidos en la presente contribución indican que con la utilización de técnicas adecuadas es posible describir las fórmulas cariotípicas y otros parámetros tales como simetría, cantidad de heterocromatina y contenido de DNA total. Estos parámetros permiten encontrar diferencias entre las especies del género.

Además de los resultados del presente trabajo, en el género sólo se conocen descripciones cariotípicas realizadas por Palomino y Rubí (1991). Estos

autores describieron las fórmulas cariotípicas para algunas procedencias de *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*. Para ambas especies el número cromosómico informado fue de $2n=34$ cromosomas. Además informaron la presencia de 6 a 10 pares de cromosomas con satélites. Los resultados obtenidos en el presente trabajo difieren, en el caso de *A. hypochondriacus*, en el número cromosómico, debido a que en la colección estudiada en el presente trabajo se encontró $2n=32$ cromosomas. También hay discrepancias en el número de satélites observados, ya que en todas las especies de amarantos estudiadas nunca se observó más de un par de cromosomas con satélite. Las diferencias encontradas con los resultados informados por Palomino y Rubí (1991) podrían deberse a que se trabajó con material de distintas procedencias y bajo largos períodos de mejoramiento.

Desde su publicación por Thellung (1926) ha existido una controversia acerca de *A. bouchonii*. Los taxónomos europeos la han mantenido como una especie separada, mientras que los americanos la han considerado dentro de *A. powellii* (Wilkin, 1992). Wilkin (1992) sobre la base de estudios morfológicos e isoenzimáticos ha propuesto el mantenimiento de *A. bouchonii* como un taxon independiente. Los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan lo propuesto por este autor, ya que se han encontrado diferencias en número cromosómico, simetría cromosómica y contenido de ADN total.

Si se grafican los índices de simetría A_1 y A_2 puede verse que las especies graníferas y *A. bouchonii* poseen cariotipos más simétricos que el resto de las especies estudiadas (Figura 14). Sin embargo, pese a las diferencias cariotípicas halladas, los resultados obtenidos indican que el análisis del cariotipo no

es siempre una herramienta sencilla de utilizar para la diferenciación de las especies de *Amaranthus*. Sin embargo, la existencia de dos números cromosómicos para algunas especies cultivadas del género, tal como fue hallado en *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* demuestra la necesidad de realizar estos estudios ya que permiten predecir la existencia de esterilidad segregacional en cruzamientos intra o interespecíficos.

1.5.2. Contenido de DNA y heterocromatina

Se han detectado diferencias en el contenido de DNA entre las especies del género.

A. dubius ($2n=64$) es la especie con mayor contenido de DNA total (Tabla 4), sin embargo posee el menor contenido por complemento haploide. Los análisis estadísticos indican que el contenido de DNA de *A. dubius* por complemento haploide presenta diferencias significativas con todas las especies analizadas, salvo con *A. quitensis*, con la que, si bien el análisis estadístico indica no significación de las diferencias, los valores de contenido de DNA muestran diferencias apreciables (Tabla 6).

En poliploides, los de origen reciente muestran un contenido de DNA proporcional al de los diploides que les dieron origen. Esto se observa, por ejemplo, en algunas serie poliploides de *Hordeum* (Bennett y Smith, 1971). Existen, sin embargo muchos casos en los que no se cumple la mencionada proporcionalidad. En *Bulnesia* (Poggio y Hunziker, 1986; Poggio *et al.*, 1986) el octoploide *B. bonariensis* posee el menor contenido de DNA por genomio y los cromosomas más pequeños.

En los citotipos tetraploides y hexaploides de *Larrea tridentata* se observa, a medida que aumenta el nivel de ploidía, una tendencia a la disminución del contenido de DNA por genoma básico (Poggio *et al.*, 1989).

Estos ejemplos, entre otros citados en la bibliografía, no son sorprendentes pues desde hace mucho tiempo se sabe que en muchos grupos vegetales los cromosomas de las especies poliploides tienden a ser más pequeños que en las especies diploides relacionadas. Es posible que los poliploides antiguos hayan tolerado reducción del tamaño de sus cromosomas a través de pérdida de segmentos duplicados o no funcionales (Grant, 1976, Poggio y Hunziker, 1986). Este podría ser el caso de *A. dubius*.

Las especies *A. mantegazzianus*, *A. bouchonii* y *A. caudatus* son las de mayor contenido de DNA (Tabla 4). *A. mantegazzianus* y *A. bouchonii* no presentan diferencias significativas entre ellas (ensayo 2), pero sí *A. mantegazzianus* con *A. caudatus* (ensayo 1). Las tres especies, por su parte muestran diferencias significativas con el resto de las especies analizadas.

El grupo de especies con menor contenido de DNA (*A. cruentus*, *A. hypochondriacus*, *A. hybridus*, *A. powellii*, *A. quitensis* y *A. spinosus*) no muestran diferencias significativas entre sí, pero, salvo *A. quitensis*, se encontraron diferencias, a nivel estadístico, al compararlas por complemento haploide con *A. dubius*.

Ohri *et al.*, (1981) analizaron el contenido de DNA de tres especies del género (*A. hypochondriacus*, *A. mantegazzianus*, (como *A. edulis*) y *A. tricolor* y sus respectivos autoploiploides). No encontraron diferencias significativas entre las especies analizadas y al analizar los poliploides (generaciones F10),

encontraron que su contenido de DNA total era el doble, no encontrando pérdida de DNA. Nuestros resultados difieren del de dichos autores pues, como ya fue dicho, *A. mantegazzianus* difiere significativamente en su contenido de DNA de *A. hypochondriacus* y por su parte *A. dubius* muestra el menor contenido de DNA al compararlo al mismo nivel de ploidía.

En general, los cambios en el contenido de DNA, están relacionados con ganancias o pérdidas de heterocromatina constitutiva, la cual comprende a la mayoría del DNA altamente repetido (Price, 1988 a, b; Flavel, 1986).

Cuando se compararon, mediante la técnica de bandeo C, a las especies de mayor y menor contenido de DNA se observó que *A. caudatus*, *A. bouchonii* y *A. mantegazzianus*, las especies con mayor contenido de DNA total, mostraban bandas C+ en la mayoría de sus cromosomas. Por otro lado, las especies con menor contenido de DNA (*A. cruentus*, *A. hypochondriacus* y *A. hybridus*) mostraron bloques heterocromáticos en unos pocos cromosomas del complemento.

Estos resultados sugieren que, al menos en parte, las diferencias en contenido de DNA de las especies estudiadas podrían ser atribuidas a diferencias en contenido de heterocromatina. En cambio no se puede concluir, como en otros casos, que el contenido de DNA esté relacionado con la simetría del cariotipo o el número cromosómico. En la Figura 14 pueden verse dos grupos de especies. Dentro del grupo de las especies con mayor simetría están incluidas las especies con mayor contenido de DNA. Sin embargo la relación contenido de DNA-simetría no puede discutirse hasta que sean analizadas un mayor número de especies del género.

Bennett (1987) ha sugerido que las diferencias en el valor C de DNA tiene implicancias adaptativas y ecológicas. Además el tamaño del genoma esta relacionado con el mínimo tiempo de generación (Bennett, 1987), tal como fue demostrado en varias líneas y poblaciones de maíz (Tito *et al.*, 1991). En nuestro caso, *A. mantegazianus* la especie que muestra mayor contenido de DNA, posee el mayor período vegetativo (Covas comunicación personal). Sin embargo, el origen, los efectos y los significados adaptativos y funcionales de las diferencias en contenido de DNA total y de heterocromatina aún no está resuelto.

2. ESTUDIOS MEIOTICOS

2.1. INTRODUCCIÓN

La existencia de apareamiento de cromosomas homólogos u homeólogos es un parámetro que refleja el grado de afinidad evolutiva y/o taxonómica entre los genomas involucrados (Sybenga, 1994).

El análisis meiótico permite diagnosticar anomalías o desviaciones del cariotipo. El hallazgo de configuraciones meióticas no usuales en Profase-Metafase I (univalentes, bivalentes heteromórficos, multivalentes, etc) sugieren la existencia de cambios estructurales. Estas configuraciones resultan del apareamiento cromosómico y formación de quiasmas o no, en el primer estado de la meiosis. Inversiones para y pericéntricas, translocaciones y fusiones en condición heterocigota dan figuras meióticas particulares, alteran el grado y posición del sobrecruzamiento y, a menudo provocan esterilidad (Poggio, 1994).

La comparación de genomas estudiando el comportamiento meiótico en híbridos ha sido muy útil para postular relaciones filogenéticas. Originalmente el término **análisis genómico** fue restringido a la identificación citogenética de especies diploides combinadas en un aloploiploide. Actualmente el término se usa en un sentido mucho más amplio e incluye el análisis de la afinidad de dos genomas relacionados mediante el análisis cuantitativo del apareamiento meiótico. La estimación cuantitativa del apareamiento meiótico de los

cromosomas es importante para entender las relaciones evolutivas y taxonómicas, debido a que el apareamiento está regulado por factores que han jugado un rol importante en los procesos especiogénicos y evolutivos (Sybenga, 1994). Por ejemplo en el género *Zea*, el estudio de las configuraciones meióticas en especies e híbridos permitió postular la naturaleza alotetraploide del maíz (*Z. mays* ssp *mays*) y otras especies afines con $2n=20$ cromosomas (Molina y Naranjo, 1987; Naranjo *et al.*, 1990; Naranjo *et al.*, 1994). En los híbridos con $2n=30$ cromosomas (*Z. mays* ssp *mays* x *Z. perennis*; *Z. diploperennis* x *Z. perennis*) la configuración más frecuente fue $5III+5II+5I$, mientras que en *Z. perennis* y en híbridos con $2n=40$ cromosomas fue $5IV+10II$. Estas configuraciones meióticas sólo pudieron ser explicadas proponiendo genomas de cinco cromosomas.

Cuando se analizan híbridos entre especies diploides, los resultados deben ser manejados con cautela. La presencia de bivalentes en un híbrido diploide indica afinidad genómica, pero el apareamiento podría ser entre cromosomas con homología parcial. Si las especies parentales se diferencian en rearrreglos estructurales pequeños, en el híbrido puede ocurrir formación de bivalentes, pero ser altamente estéril. Esto puede atribuirse al fenómeno denominado por Stebbins (1971) hibridez estructural críptica. Este concepto se basa en considerar que las especies parentales difieren entre ellas en rearrreglos cromosómicos muy pequeños en especial, translocaciones intersticiales, las cuales no involucran a las regiones teloméricas. El apareamiento se inicia en general por las regiones teloméricas y/o las centroméricas, (si dichas zonas son homólogas entre los dos cromosomas) y, si las regiones no homólogas intersticiales no

son extensas, el apareamiento se completa y no se llegan a formar multivalentes. La segregación de las regiones no homólogas lleva a la formación de gametas con duplicaciones y deficiencias (Stebbins, 1971). En otros casos, diferencias en DNA repetido podría interferir con el apareamiento normal aunque existan regiones homólogas. Cuando se analizan relaciones entre especies mediante el análisis del comportamiento meiótico de los híbridos, otro factor muy importante a tener en cuenta es que tal vez, no todos los híbridos entre individuos pertenecientes a las mismas dos poblaciones se comporten de igual manera. Por ejemplo el estudio del comportamiento meiótico de individuos pertenecientes a dos poblaciones simpátricas de *Glandularia incisa* y *G. pulchella* y seis de sus híbridos naturales mostró que estos últimos presentaban una variabilidad de comportamiento meiótico significativa en cuanto a la frecuencia de bivalentes, univalentes y quiasmas (Poggio *et al.*, 1993). Los resultados obtenidos permitieron postular que las especies parentales son polimórficas para genes que regulan los mecanismos moleculares de sinapsis y/o recombinación, y que los híbridos con distintas combinaciones génicas poseerían diferencias en la capacidad para aparearse o en la frecuencia de entrecruzamiento. También puede postularse que las especies parentales son polimórficas o politípicas para mutaciones que determinan la posición de los genomas en el núcleo. Según Jackson (1984) el apareamiento entre cromosomas de distintas especies dependería de la posición de los genomas en el núcleo, y ésta podría variar entre los distintos híbridos si hay diferencias significativas dentro de las poblaciones parentales

Aunque el comportamiento meiótico puede estar afectado por factores genéticos o ambientales, en muchos casos ha permitido conocer el mecanismo de cambios genómicos que acompañaron a la especiación, analizar mecanismos de recombinación cromosómica y aislamiento reproductivo postcigótico.

2.2. MATERIALES UTILIZADOS

Los materiales estudiados, junto con su número de herbario se detallan en la Tablas 2 y 7. Las especies estudiadas (Tabla 2) fueron cultivadas en el Instituto Fitotécnico de Santa Catalina (FCAF, UNLP) a partir de semillas legadas por el Ing. G. Covas, el Kew Herbarium, el Ing. Villamil y por el autor. Los híbridos estudiados fueron legados por los Ing. J. Gesumaría y G. Peiretti y coleccionados en el Campo Experimental de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba. Dicho material fue detectado por sus características morfológicas en los surcos de los cultivos mantenidos en dicho Campo Experimental. El progenitor femenino corresponde a la especie en cuyo surco se encontró el material y será nombrado en primer término. La determinación del material fue confirmada por el Ing. Agr. Guillermo Covas. Los ejemplares de herbario serán depositados en el Herbario del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA (BAFC).

2.3. METODOS

El estudio meiótico se realizó en anteras provenientes de botones florales previamente fijados en 3:1 (Alcohol absoluto: Acido acético glacial). La tinción y aplastado fueron realizados en hematoxilina propiónica al 2%, utilizando citrato férrico como mordiente (Sáez, 1960; Núñez, 1968). Los preparados se hicieron permanentes por congelamiento en CO₂ y montados en Euparal. La viabilidad del polen se calculó contando 100 o más granos de polen teñidos con el colorante de Alexander (1967). No se realizaron estudios de fertilidad, mediante el

calculo de producción de semilla ya que al momento de colección del material este era muy joven.

2.4. RESULTADOS

El número gamético (n) de las especies estudiadas, el número somático ($2n$) de los híbridos, las configuraciones meióticas y la viabilidad del polen se muestran en las Tablas 2 y 7.

2.4.1. Comportamiento meiótico de las especies y cultivares.

Todas las especies presentaron meiosis normal con formación de bivalentes. Se observaron 16 bivalentes (16II) en *A. albus* (Fig. 16A), *A. bouchonii* (Fig. 16B), *A. caudatus* (Fig. 15a), *A. quitensis* (Fig. 15b y 23A), *A. hypochondriacus* (Fig. 15d), *A. hybridus* (Fig. 15c), *A. mantegazzianus* (Fig. 16C). Se observaron 17 bivalentes (17II) en *A. cruentus* (Fig. 15e), *A. crispus* (Fig. 17B), *A. deflexus* (Fig. 17C), *A. lividus* (Fig. 18C), *A. muricatus* (Fig. 17A), *A. powelli* (Fig. 18A), *A. retroflexus* (Fig. 18B), *A. standleyanus* (Fig. 17D), *A. viridis* (Fig. 18D) y en *A. spinosus* (Fig. 15F). *A. dubius* muestra 32 bivalentes (32II) (Fig. 15g). En células en diacinesis-prometáfase I, con poco aplasto, es frecuente la presencia de asociaciones secundarias de bivalentes, generalmente en grupos de dos (Fig. 15f).

2.4.2. Comportamiento meiótico de los híbridos entre especies con $2n=32$ cromosomas.

Los híbridos entre *A. quitensis* y las especies cultivadas como pseudoce-reales *A. caudatus* (Fig. 19a) , *A. hypochondriacus* (Fig. 19c) y *A. mantegazzianus* (Fig. 21D) presentaron 16II (Tabla 7). Todos estos híbridos poseen baja viabilidad de polen (5-33%) (Tabla 7) y en algunos casos se observan dos grupos de ocho bivalentes en PMI. El híbrido entre *A. hybridus* y *A. quitensis* presentó 16II (Fig. 19b), observándose mayor cantidad de bivalentes asociados secundariamente en grupos de dos que en los híbridos anteriores. La viabilidad del polen en este último es bastante elevada (55-60%) (Fig. 23B, Tabla7). El híbrido *A. mantegazzianus* x *A. hypochondriacus* también presentó la formación de 16II y una baja viabilidad de polen (7%) (Fig. 21D) (Tabla 7). El híbrido *A. mantegazzianus* x *A. hybridus* presentó una viabilidad de polen del 5 al 15% con formación de 16II (Fig. 21A)(Tabla 7). El híbrido *A. mantegazzianus* x *A. caudatus* mostró 16II y una alta inviabilidad de polen (10 al 12%) (Fig. 20A y 23C, Tabla 7). Por su parte el híbrido *A. caudatus* x *A. hybridus* también presentó una baja viabilidad de polen (5-8%) (Fig. 20C, Tabla 7) con formación de 16II. El híbrido *A. caudatus* x *A. hypochondriacus* (16II) tiene 0% de viabilidad del polen (Fig. 20B y 23D, Tabla 7). Por último el híbrido *A. hypochondriacus* x *A. hybridus* (16II) también presento una muy baja viabilidad de polen (12%) (Fig. 21B)(Tabla 7).

2.4.3. Comportamiento meiótico de los híbridos entre especies con $2n=32$ y $2n=34$ cromosomas.

El híbrido *A. cruentus* ($n=17$) x *A. quitensis* ($n=16$) (Fig.19d, 22D) presentó una configuración de 15II + 1III en todas las células estudiadas, con un 5 al 7% de polen viable (Tabla7). El híbrido *A. caudatus* x *A. cruentus* presentó un tri-valente en todas las células estudiadas y su viabilidad de polen fue del 7% (Fig. 20D, 22 A, B, C, Tabla 7). En el híbrido *A. hybridus* ($n=16$) x *A. spinosus* ($n=17$) (Fig. 19e), a diferencia de los anteriores, se observó un bajo número de bivalentes ($\bar{x}\pm ES=7,23\pm 0,28$) y una media de $18,54\pm 0,56$ univalentes en las células analizadas. Este último híbrido sería altamente estéril (3% de viabilidad de polen) (Tabla 7).

2.4.4. Comportamiento meiótico de los híbridos entre especies con $2n=34$ y $2n= 64$ cromosmas.

El híbrido entre *A. dubius* ($n=32$) y *A. spinosus* ($n=17$) posee $2n= 49$ y posee muy baja viabilidad de polen (5%) (Tabla 7) y la meiosis presenta elevada frecuencia de univalentes ($\bar{x}\pm ES=15,53\pm 0,50$), siendo la media de bivalentes de $16,12\pm 0,31$, no observándose ningún multivalente en las células analizadas (Fig. 19f).

Tabla 7: Números cromosómicos, configuraciones meióticas y viabilidad de polen de los híbridos estudiados en el presente trabajo.

Híbrido	Nº herbario	2n	Configuración Meiótica			Nº células estudiadas	Viabilidad de Polen (%)
			I	II	III		
<i>A. cau</i> x <i>A. qui</i>	EJG 101	32		16		19	15
	EJG 201	32		16		27	17
	EJG 301	32		16		25	15
<i>A. hyb.</i> x <i>A. qui</i>	EJG 104	32		16		23	60
	EJG 204	32		16		22	55
<i>A. hyp</i> x <i>A. qui</i>	EJG 110	32		16		28	5
	EJG 210	32		16		30	5
	EJG 211	32		16		23	7
<i>A. man</i> x <i>A. qui</i>	EJG 218	32		16		28	33
<i>A. man</i> x <i>A. hyp</i>	EJG 321	32		16		33	7
<i>A. man</i> x <i>A. hyb</i>	EJG 214	32		16		25	15
	EJG 215	32		16		35	5
<i>A. man</i> x <i>A. cau</i>	EJG 315	32		16		28	10
	EJG 325	32		16		25	12
<i>A. cau</i> x <i>A. hyb</i>	EJG 216	32		16		30	8
	EJG 227	32		16		35	5
<i>A. cau</i> x <i>A. hyp</i>	EJG 308	32		16		27	0
	EJG 309	32		16		25	0
<i>A. hyp</i> x <i>A. hyb</i>	EJG 205	32		16		35	12
<i>A. cru</i> x <i>A. qui</i>	EJG 102	33		15	1	30	5
	EJG 202	33		15	1	30	5
	EJG 302	33		15	1	25	7
<i>A. cau</i> x <i>A. cru</i>	EJG 318	33		15	1	28	7
<i>A. hyb</i> x <i>A. spi</i>	EJG 209	33	17	8		18	3
<i>A. dub</i> x <i>A. spi</i>	EJG 120	49	15	17		17	5

A. cau=*A. caudatus*; *A. cru*=*A. cruentus*; *A. dub*=*A. dubius*; *A. hyb*=*A. hybridus*; *A. hyp*=*A. hypochondriacus*; *A. man*=*A. mantegazzianus*; *A. qui*=*A. quitensis*; *A. spi*=*A. spinosus*



Figura 15. a= *A. caudatus* (Prometafase I, 16II); b=*A. quitensis* (Diacinesis, 16II); c=*A. hybridus* (Diacinesis, 16II); d=*A. hypochondriacus* (Prometafase I, 16II); e=*A. cruentus* (Metafase I, 17II); f= *A. spinosus* (Prometafase I, 17II); g=*A. dubius* (Prometafase I, 32II). La barra indica 10 μ m. Todas con el mismo aumento.

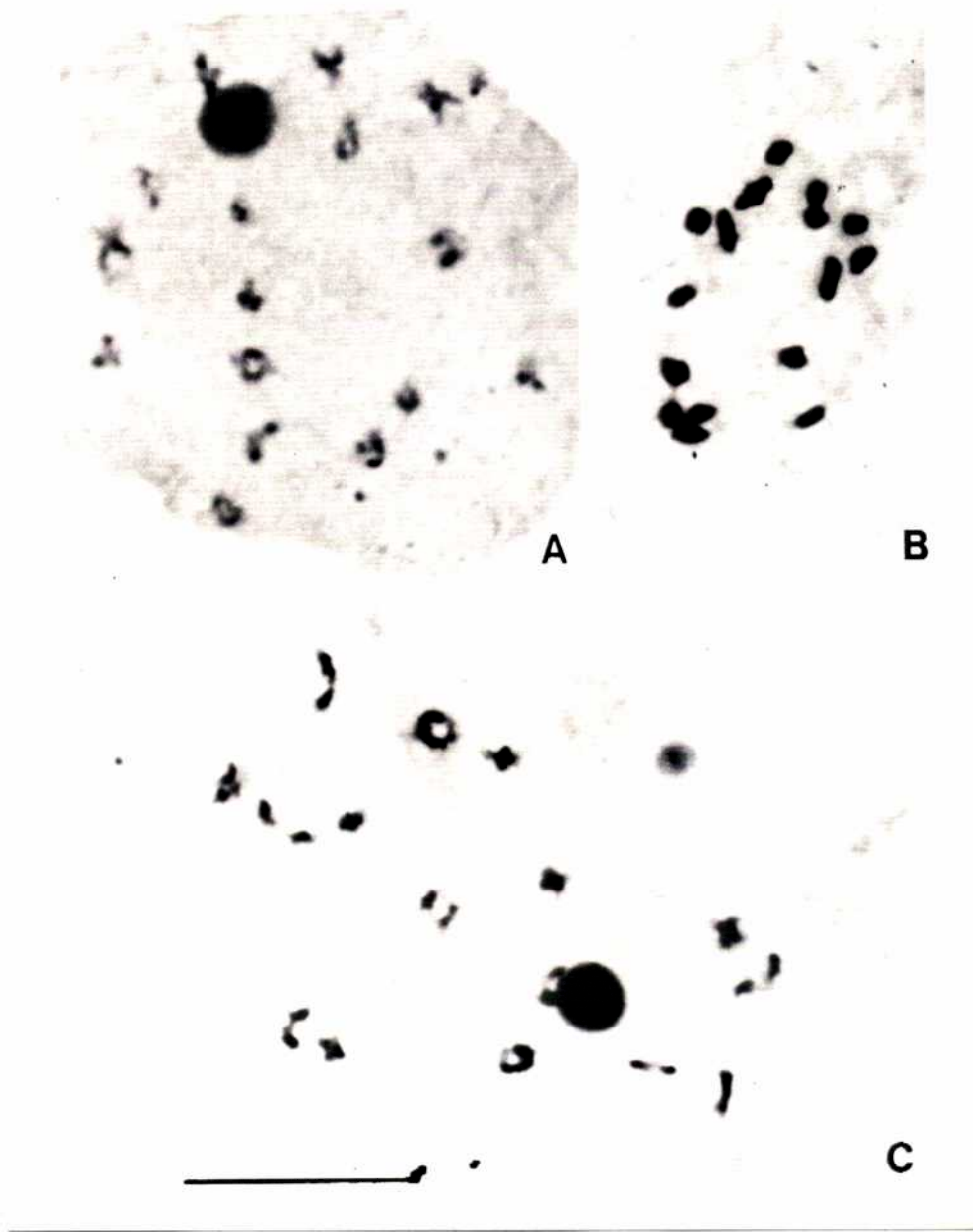


Figura 16. A= *A. albus* (Diacinesis, 16II); B=*A. bouchonii* (Prometafase I, 16II); C=*A. mantegazzianus* (Diacinesis, 16II). La barra indica 10 μ m. Todas con el mismo aumento.

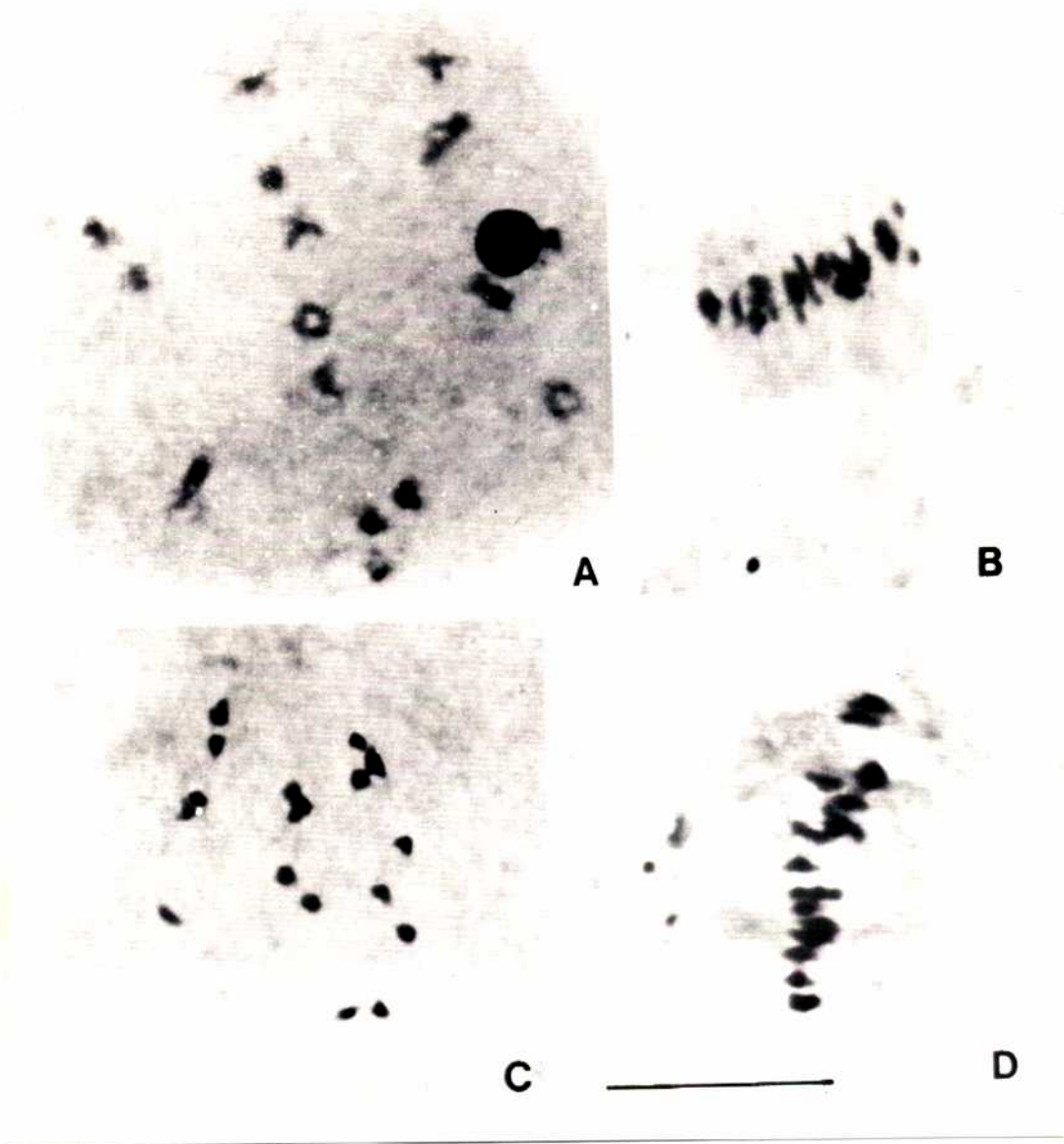


Figura 17. A=*A. muricatus* (Diacinesis, 17II); B=*A. crispus* (Metafase I, 17II); C=*A. deflexus* (Prometafase I, 17II); D=*A. standleyanus* (Metafase I, 17II). La barra indica 10µm. Todas con el mismo aumento.

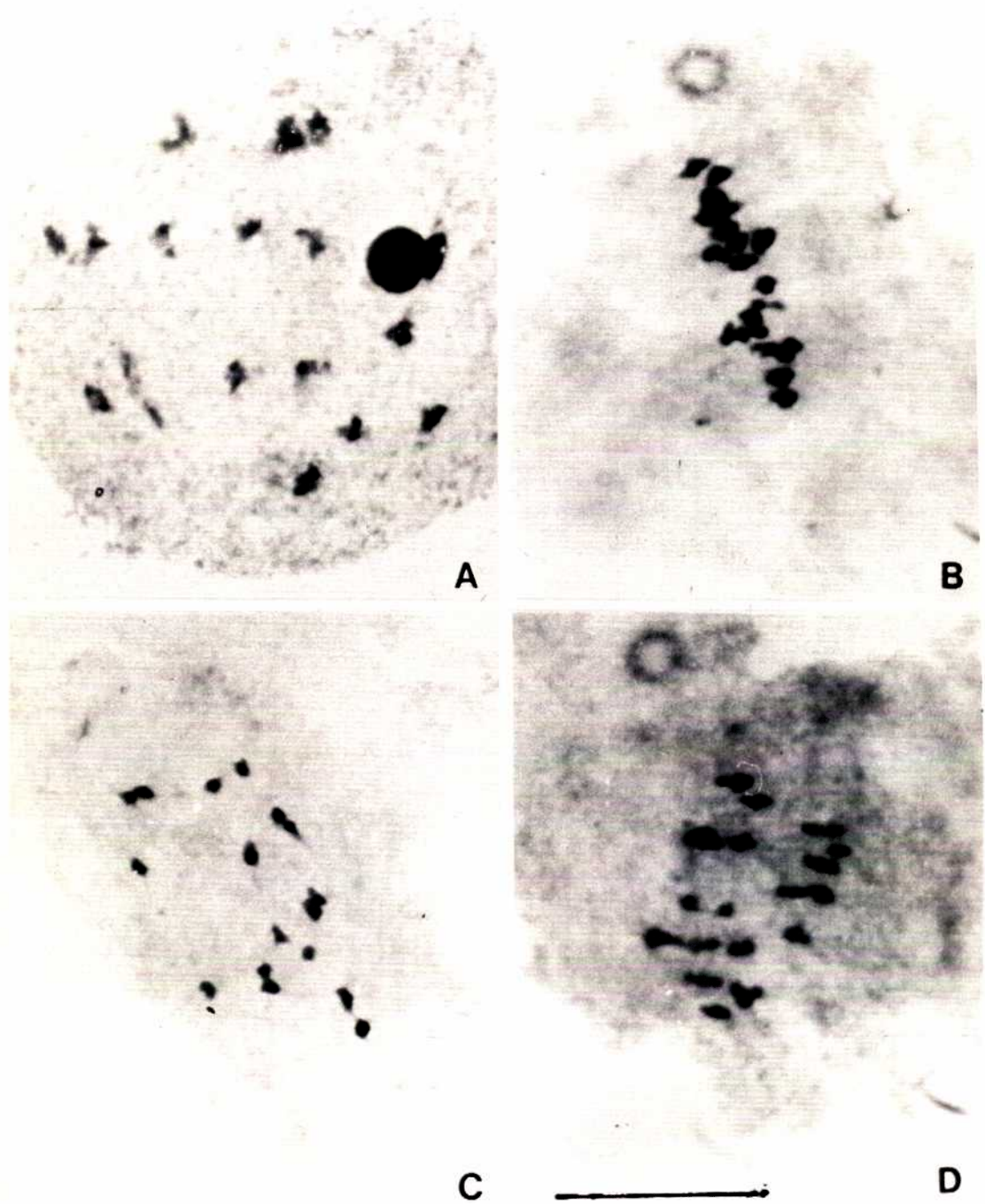


Figura 18. A=*A. powellii* (Diacinesis, 17II); B=*A. retroflexus* (Metafase I, 17II); C=*A. lividus* (Prometafase I, 17II); D=*A. viridis* (Metafase I, 17II). La barra indica 10 μ m. Todas con el mismo aumento.

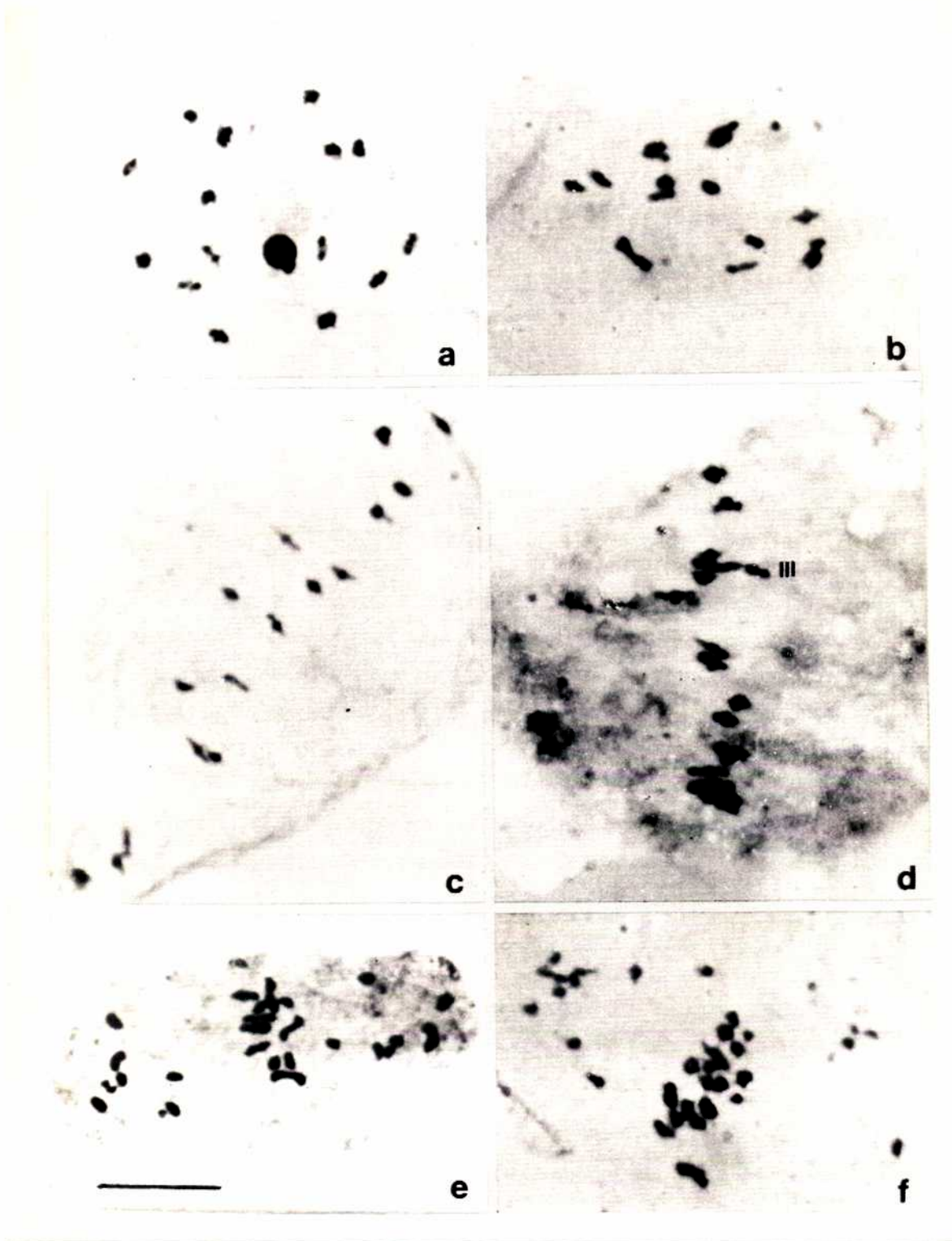


Figura 19. a= *A. caudatus* x *A. quitensis* (Diacinesis, 16II); b=*A. hybridus* x *A. quitensis* (Prometafase I, 16II); c=*A. hypochondriacus* x *A. quitensis* (Metafase I, 16II); d=*A. cruentus* x *A. quitensis* (Metafase I, 15II+1III). e=*A. hybridus* x *A. spinosus* (Metafase I, 17I+8II); f=*A. dubius* x *A. spinosus* (Metafase I, 15I+17II). La barra indica 10µm. Todas con el mismo aumento.

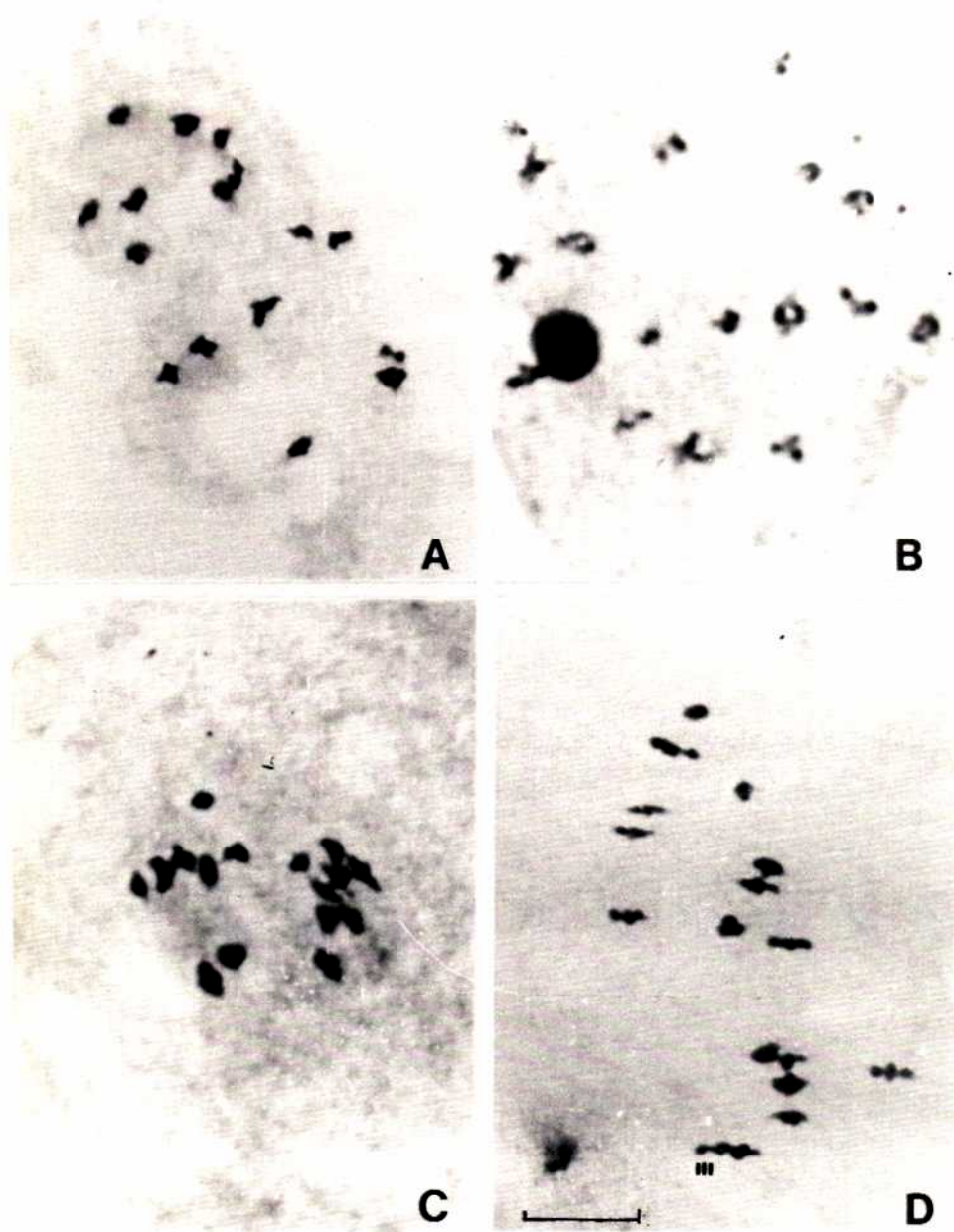


Figura 20. A=A. caudatus x A. mantegazzianus (Prometafase I, 16II); B=A. caudatus x A. hybridus (Diacinesis, 16II); C=A. caudatus x A. hypochondriacus (Metafase I, 16II); D=A. caudatus x A. cruentus (Metafase I, 15II+1III). La barra indica 10µm. Todas con el mismo aumento.

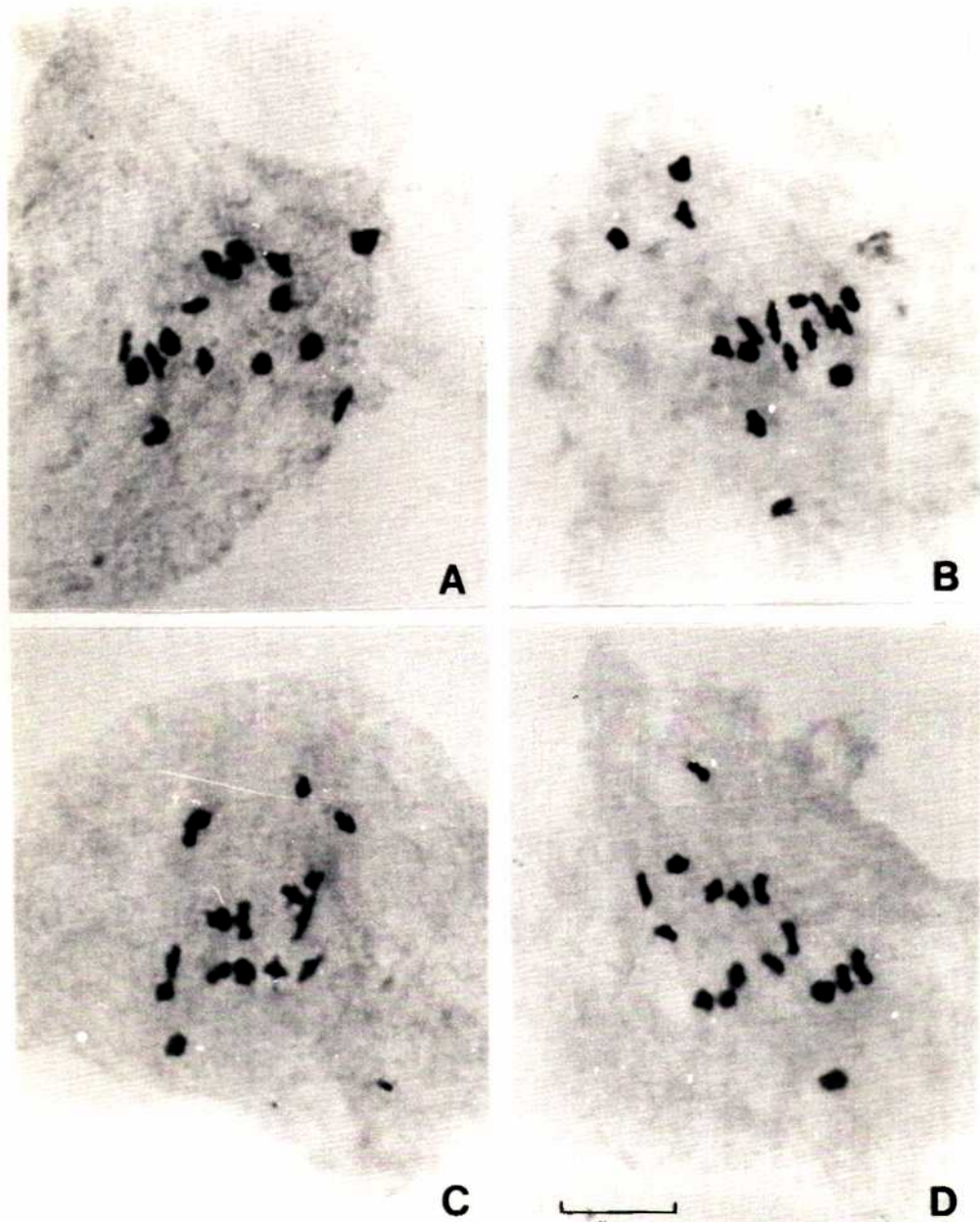


Figura 21. A=*A. mantegazzianus* x *A. hybridus* (Prometafase I, 16II); B=*A. hybridus* x *A. hypochondriacus* (Prometafase I, 16II); C=*A. mantegazzianus* x *A. hypochondriacus* (Prometafase I, 16II), D=*A. mantegazzianus* x *A. quitensis* (Prometafase I, 16II). La barra indica 10 μ m. Todas con el mismo aumento.

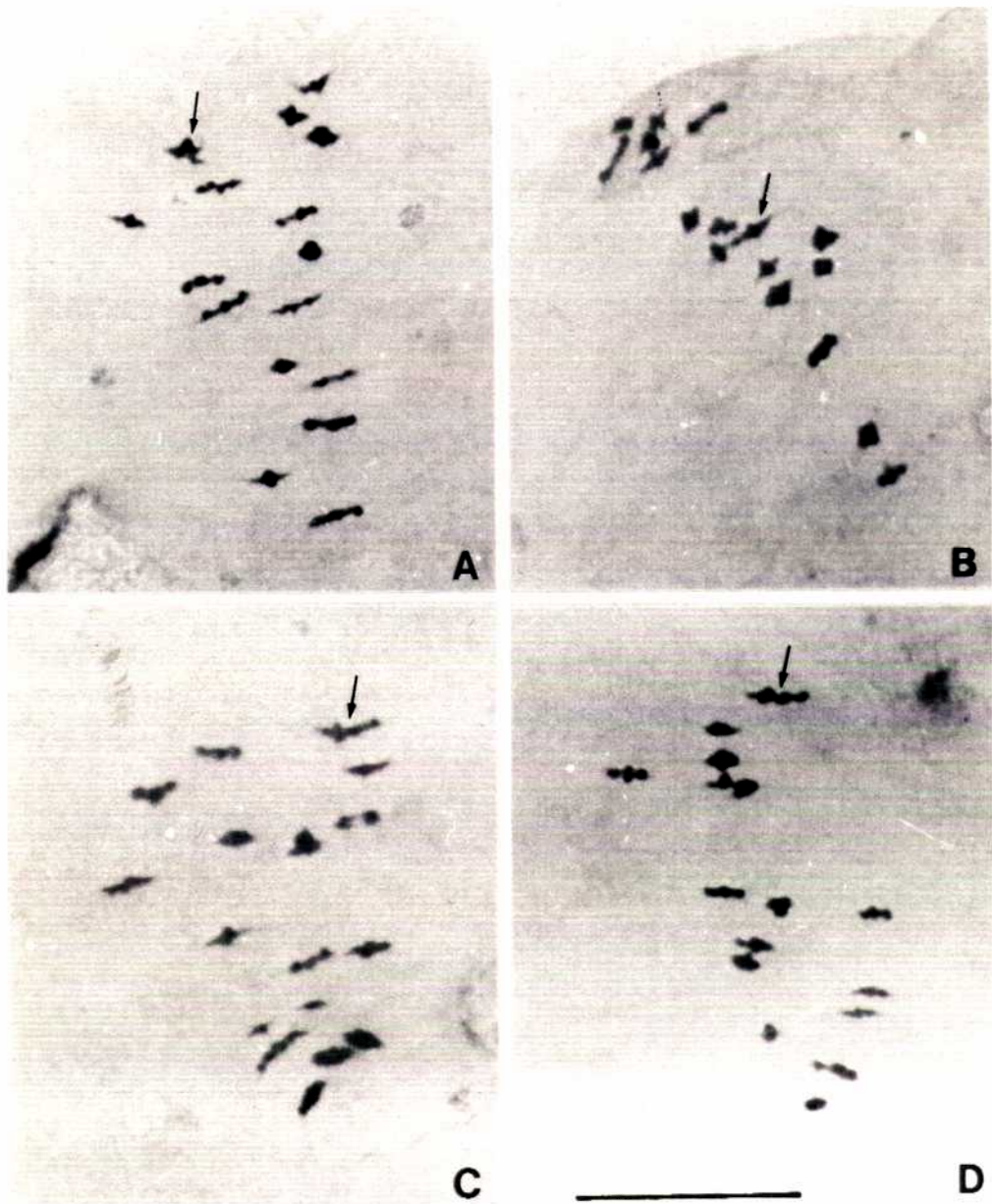


Figura 22. Metafasas I mostrando distintas configuraciones de los trivalentes. A= trivalente en foma de V; B,C y D=trivalentes lineales. A-C =A. caudatus x A. cruentus; D= A. cruentus x A. quitensis. La barra indica 10 μ m. Todas con el mismo aumento.

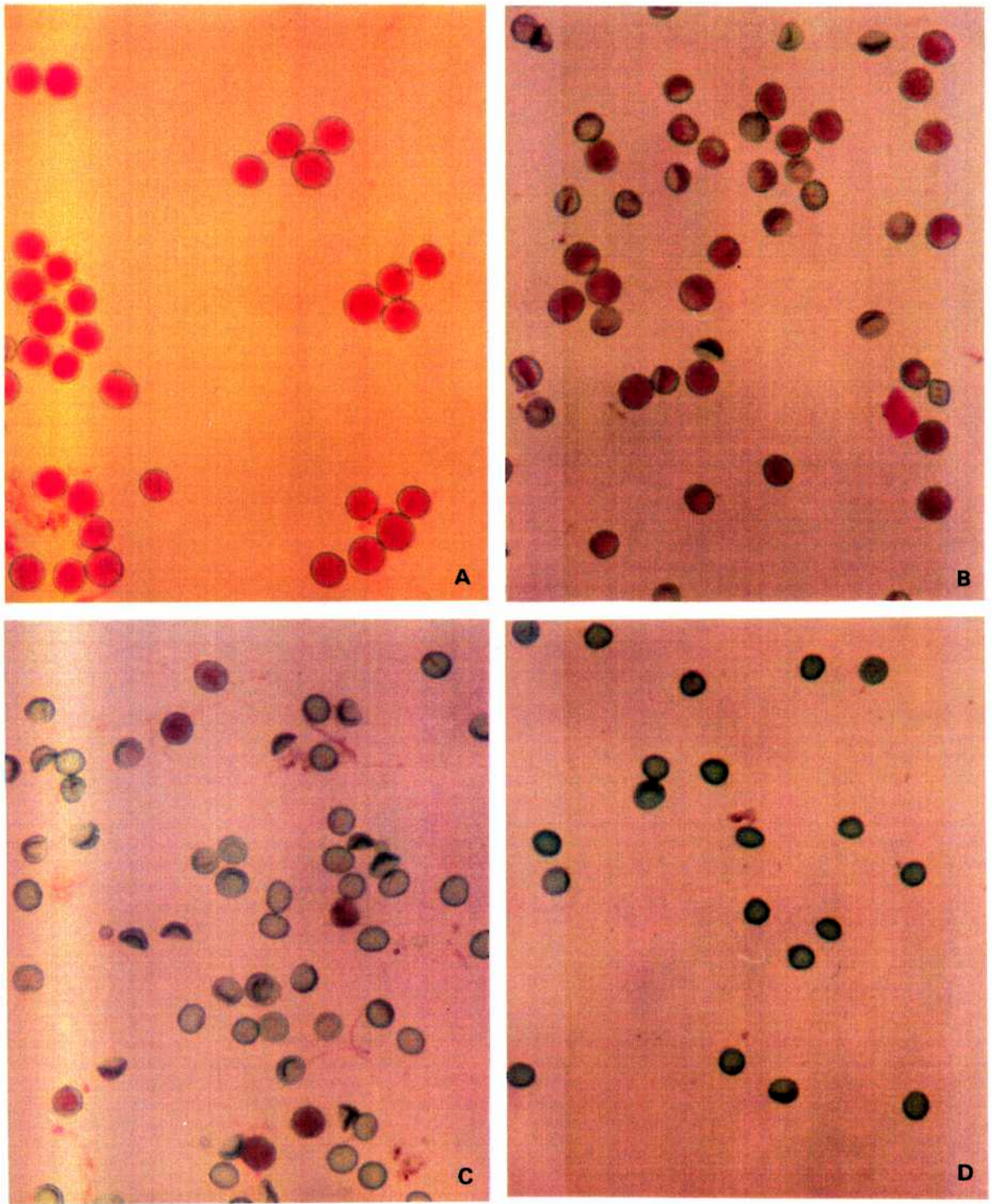


Figura 23. Granos de polen teñidos con el colorante de Alexander. A=A. quitensis: 98% viable; B=A. hybridus x A. quitensis: 60% viable; C=A. mantegazzianus x A. caudatus: 10% viable; D= A. caudatus x A. hybridus: 0% viable.

2.5. DISCUSION

El comportamiento meiótico de todas las especies fue regular con formación de bivalentes tanto abiertos como cerrados, dependiendo de la morfología cromosómica. En general los cromosomas t mostraron un sólo quiasma terminal en el brazo largo.

En este trabajo se analizan por primera vez los comportamientos meióticos de *A. cruentus* (n=17); *A. bouchonii* (n=16); *A. deflexus* (n=17); y *A. crispus* (n=17) y se confirman los números gaméticos de las especies que figuran en la Tabla 1. En todas las especies la viabilidad del polen, medida mediante la tinción con el colorante de Alexander, fue elevada y varió entre el 95-98%,. (Fig. 23 A).

a). Híbridos entre especies con n=16 cromosomas

Los híbridos entre especies con n=16 cromosomas presentaron meiosis regular con formación de 16II. Los híbridos *A. mantegazzianus* x *A. hypochondriacus* y *A. mantegazzianus* x *A. caudatus* fueron estudiados con anterioridad por Pal y Khoshoo (1972, 1973a) como *A. edulis* x *A. hypochondriacus* y *A. edulis* x *A. caudatus*. Con respecto al híbrido *A. mantegazzianus* x *A. hypochondriacus* se encontró, al igual que Pal y Khoshoo (1972, 1973a) que la meiosis fue regular con formación de 16II. Estos autores informan de la existencia de por lo menos dos bivalentes heteromorfos. En los híbridos aquí analizados también al menos dos bivalentes parecen ser heteromorfos (Fig. 21C). Aunque el pequeño tamaño de los mismos hace difícil precisar con certeza la magnitud de las

diferencias, es altamente probable que el heteromorfismo se deba a las diferencias significativas en el contenido de DNA genómico total entre ambas especies, informadas anteriormente. Tanto en los híbridos analizados por Pal y Khoshoo (1972, 1973a) como en los estudiados en el presente trabajo, la disyunción fue regular en Anafase I. Sin embargo, en los híbridos estudiados en este trabajo no se encontró la presencia de micropolen informada por dichos autores. Por otro lado Pal y Khoshoo (1972, 1973a) reportan 0% de fertilidad de polen para este híbrido, mientras que en el presente trabajo se encontró 7% de viabilidad de polen. Estos resultados sugieren que ambas especies poseerían un mecanismo de aislamiento reproductivo post-cigótico. El origen del mismo podrían ser pequeñas reestructuraciones que disminuirían la homología cromosómica entre ambas especies y/o genes actuando desfavorablemente en la formación de gametas.

En el híbrido *A. mantegazzianus* x *A. caudatus*, por otro lado, Pal y Khoshoo (1972, 1973a) encontraron un porcentaje de polen viable un poco mayor (25%) del encontrado en el presente trabajo (10-12%). El resto del comportamiento meiótico fue semejante aunque en los híbridos aquí estudiados no se encontró micropolen ni puentes en Anafase I como fue informado por dichos autores. Coons (1981) en un estudio taxonómico de relaciones interespecíficas señala que el análisis morfológico no apoya la separación de *A. mantegazzianus* como una especie distinta de *A. caudatus*. En nuestra opinión el análisis citogenético de los híbridos indica un aislamiento post-cigótico significativo entre ambas especies lo que implica que ambas entidades se comportan como diferentes especies biológicas por aislamiento. Además, según los estudios realizados

por Hunziker (1943), ambas especies se diferencian en el color del tallo, en la morfología de las hojas y pecíolos, en la morfología, color y forma de crecimiento de las inflorescencias y en la morfología floral. Según esto, *A. caudatus* y *A. mantegazzianus* serían, según la clasificación de Grant (1981), especies taxonómicas.

En el híbrido *A. mantegazzianus* x *A. hybridus* Pal y Khoshoo (1973a) informaron que las plántulas F_1 no prosperaban más allá de la primera o segunda hoja, las cuales presentaban una morfología distorsionada, y luego morían. Es decir estas especies presentarían un aislamiento reproductivo postcigótico por mortalidad de la F_1 híbrida. Pal y Khoshoo (1973a) señalan que Covas informó de un híbrido semifértil entre ambas especies. Sin embargo, Covas (comunicación verbal) comunicó que, en realidad este híbrido es *A. mantegazzianus* x *A. quitensis*. Los híbridos *A. mantegazzianus* x *A. hybridus* estudiados en el presente trabajo mostraron un desarrollo morfológico normal, mientras que en la meiosis presentaron 16II y un 20% de polen viable. Varios autores (Pal y Khoshoo 1972, 1973a; Pal et al., 1982) señalan que *A. hybridus* es una especie polimórfica y esto podría explicar las diferencias entre las F_1 estudiadas hasta el momento por diferentes autores.

El comportamiento meiótico del híbrido *A. mantegazzianus* x *A. quitensis* es semejante al ya mencionado estudiado por Covas como *A. mantegazzianus* x *A. hybridus*. Ambos híbridos presentaron meiosis normal y semiviabilidad de polen. Dado que *A. mantegazzianus* es objeto de un intensivo programa de mejoramiento en nuestro país, la introducción de genes de la especie silvestre

A. quitensis, si ello es agronomicamente deseable, sería posible ya que los híbridos son semifértiles.

Los híbridos *A. caudatus* x *A. quitensis* y *A. hypochondriacus* x *A. quitensis* fueron estudiados por primera vez en nuestro laboratorio. Ambos híbridos mostraron meiosis normal pero baja tinción de polen (5-17%). Por el contrario, el híbrido *A. hybridus* x *A. quitensis* presentó una meiosis normal con formación de 16II y una viabilidad del polen apreciablemente mayor (50%), aunque significativamente menor que la que presentan las especies progenitoras. Estos resultados sugieren que ambas especies, aunque algo afines, presentan algún grado de aislamiento reproductivo postcigótico y por lo tanto no pertenecerían al mismo taxón. Coons (1977, 1981) señaló que *A. hybridus* y *A. quitensis* serían coespecíficos, siendo *A. quitensis* una subespecie de *A. hybridus*, sobre la base de estudios de la morfología floral. Los resultados del presente trabajo apoyan lo sugerido por A.T. Hunziker (comunicación personal) acerca de que ambos taxones serían buenas especies taxonómicas. Además, las comparaciones hechas con alozimas muestran diferencias entre ambos taxa (Hauptli y Jain, 1984).

El híbrido *A. hypochondriacus* x *A. hybridus* presentó meiosis normal pero una baja viabilidad de polen (12%). Este resultado es diferente al informado por Pal y Khoshoo (1973a) quienes informaron para este híbrido una viabilidad del polen del 55%. Los resultados informados por estos autores están más de acuerdo a la similitud morfológica de ambas especies encontrada por Coons (1977), a la consideración de que *A. hybridus* sería el progenitor silvestre de *A. hypochondriacus* (Sauer, 1967; Pal y Khoshoo, 1973, 1974; Pal *et al.*, 1990) y

a la similitud genética informada por Hauptli y Jain (1984). Nuevamente, el polimorfismo de *A. hybridus* podría explicar las diferencias entre los resultados obtenidos por Pal y Khoshoo (1973a) y los encontrados en el presente trabajo.

La F₁ del híbrido *A. caudatus* x *A. hybridus* fue informada como inviable por Pal y Khoshoo (1972, 1973a), mientras que el estudiado en el presente trabajo mostró buen vigor, meiosis normal pero alta esterilidad (6-8% de polen viable). Estos resultados estarían de acuerdo a los informados por Hauptli y Jain (1984) quienes, en base a datos electroforéticos, señalaron que *A. caudatus* sería la especie granífera más alejada genéticamente de *A. hybridus*.

El comportamiento del híbrido *A. caudatus* x *A. hypochondriacus* es semejante al informado por Pal y Khoshoo (1972, 1973a). En ambos casos presentó meiosis normal pero muy baja viabilidad del polen, 0% en el presente estudio y 3,4% en el de aquellos autores. Por su parte Gupta y Gudu (1991) encontraron entre 10,8 y 15,1% de viabilidad de polen en híbridos *A. caudatus* x *A. hypochondriacus* y 1,02 y 1,92% en el cruzamiento recíproco.

La presencia de meiosis regular y esterilidad o semiesterilidad medida por la viabilidad del polen (0-58%) sugiere que las especies involucradas en cada uno de los híbridos estudiados diferirían en pequeños rearrreglos cromosómicos que no impedirían la normal formación de bivalentes pero reducirían el porcentaje de gametas viables. Este fenómeno fue denominado por Stebbins (1971) hibridez estructural críptica. Situaciones semejantes se han encontrado en varios grupos vegetales como por ejemplo en todos híbridos interespecíficos en las especies de *Bromus* de la Sección *Ceratochloa* (Naranjo, 1985). Este resultado también podría explicarse por la existencia de diferencias en pequeños

bloques heterocromáticos que, sin afectar el apareamiento de las zonas homólogas, podrían interferir con la normal expresión de algunos genes, disminuyendo la fertilidad.

El análisis genómico es uno de los criterios más ampliamente utilizados para el establecimiento de relaciones filogenéticas. Una de las limitaciones de esta herramienta es que el apareamiento puede estar influenciado por los genotipos de las especies progenitoras (Poggio *et. al.*, 1993).

Jackson (1982) propone un modelo para explicar las diferencias en las frecuencias de quiasmas y las fallas en el apareamiento entre genomas homólogos y homeólogos. Su modelo propone que los cromosomas tienen un sitio de inserción a la membrana nuclear, el cual se encuentra controlado genéticamente. La existencia de politipismos y polimorfismos para dichos sitios de inserción podrían causar cambios en el proceso sináptico y la reducción del sobrecruzamiento en los híbridos (Jackson, 1984). Por lo tanto híbridos entre las mismas especies, pero con distintos individuos progenitores, podrían diferir en los sitios de inserción a la membrana y dependiendo de la distancia espacial de los genomas, podrían diferir en su frecuencia de quiasmas y en la formación de bivalentes.

Este no sería el caso de los híbridos analizados, ya que estos presentan siempre una formación regular de bivalentes y no se detecta una apreciable disminución en la frecuencia de quiasmas.

Es importante resaltar que, en el presente trabajo, cuando se estudió más de un individuo híbrido de una dada combinación, los resultados obtenidos fueron semejantes. Esto estaría indicando que en los cultivares y procedencias

utilizadas en el presente trabajo no existiría variación en genes que afecten el apareamiento, la frecuencia de quiasmas o la posición de los genomas en la membrana.

b)Híbridos entre especies con n=16 y n=17 cromosomas

Los híbridos que presentan *A. cruentus* (n=17) como uno de los progenitores y siendo el otro una especie con n=16 (*A. caudatus* x *A. cruentus* y *A. cruentus* x *A. quitensis*) siempre formaron 15II+1III. Gupta y Gudu (1991) informaron que la F₁ del híbrido *A. caudatus* x *A. cruentus* muere inmediatamente después de germinar. En nuestro caso el híbrido estudiado fue viable, aunque presentó baja viabilidad del polen (7%). Esto sugiere que ambas especies presentan un elevado aislamiento reproductivo. No se conoce la existencia de comunicaciones previas del estudio de híbridos *A. cruentus* x *A. quitensis*.

El trivalente encontrado en ambos híbridos apareció con diferentes conformaciones: en cadena, en V o "frying pan" (Fig. 22). La orientación lineal fue la que se presentó con mayor frecuencia y por lo tanto existiría una alta probabilidad de que uno de los cromosomas se pierda. Aún así, gametas con 16 ó 17 cromosomas se pueden formar en estos híbridos, los cuales, en generaciones avanzadas, pueden dar individuos con 2n=32, 2n=33 ó 2n=34 cromosomas. Dada la elevada frecuencia de formación de un III y la alta probabilidad de pérdida de un cromosoma durante su segregación, sería, por tanto muy probable la existencia de progenie híbrida con 2n=32 cromosomas. Esto explicaría la existencia de 2n=32 en la generación F3 de un híbrido entre *A. quitensis* (2n=32) y *A. standleyanus* (2n=34), legado por G. Covas.

Pal *et al.* (1982) sugirieron que $x=17$ habría surgido de $x=16$ por trisomía primaria. Esta hipótesis se basó en el estudio de un híbrido entre *A. hypochondriacus* con $n=16$ y un *A. hybridus* africano de $n=17$. En este híbrido observaron la presencia de $15II+1III$ en el 98% de las células estudiadas. En base a esta hipótesis las especies con $2n=34$ cromosomas representarían una condición tetrasómica y la formación de un IV estaría suprimida por acción génica, diferenciación intercromosómica o apareamiento diferencial.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo y la hipótesis de un origen por trisomía primaria del cromosoma extra de las especies con $n=17$ sugerida por Pal *et al.* (1982), apoyarían la hipótesis del origen monofilético (común) de las especies cultivadas del género. El cromosoma extra que posee *A. cruentus* sería "homólogo" a un cromosoma de su complemento y a su vez a uno de los cromosomas de *A. caudatus* y de *A. quitensis*. Esta hipótesis estaría de acuerdo a la similitud genómica encontrada en el presente trabajo entre *A. quitensis* y las especies cultivadas. Otra evidencia a favor de esta teoría fue la similitud genética entre estas especies informada por Hauptli y Jain (1984) en base a datos isoenzimáticos.

La configuración más frecuente $8II + 17I$ que presenta el híbrido entre *A. hybridus* ($n=16$) y *A. spinosus* ($n=17$) nos indica que ambas especies poseerían 8 cromosomas con alta homología. La presencia de algunas células con menor cantidad de bivalentes ($5II$ y $6II$) podría atribuirse a fallas en la formación de algunos quiasmas entre los genomas homeólogos. Por otra parte, las pocas células con $9II$ podrían explicarse por la formación de pseudobivalentes o autosindesis. Estas observaciones constituyen una fuerte evidencia de que

las especies de amarantos analizadas serían alotetraploides. Estos datos sugieren que $n=16$ ($x_1 = 16$) deriva de $x=8$ y $n=17$ ($x_2 = 17$) provendría, como ya fue discutido anteriormente, de $n=16$ ($x_1 = 16$) por trisomía primaria. La asociación secundaria de bivalentes observados en especies e híbridos apoyan la hipótesis de la anfiploidía. Darlington (1928) definió el apareamiento secundario o la asociación secundaria de bivalentes como la disposición de los bivalentes de a pares con más frecuencia que la esperada por el azar en la primera metafase meiótica de varias especies de plantas poliploides. Tanto Darlington (1928) como Lawrence (1931) relacionan a la asociación secundaria de bivalentes con la afinidad específica entre cromosomas.

Las evidencias a favor de que la existencia de asociación secundaria está determinada por la equivalencia genética de los cromosomas, se obtuvieron cuando se pudo demostrar la existencia de asociaciones secundarias en especies cuyo origen poliploide era conocido. Riley (1960) encontró en *Triticum aestivum* ($6x$) asociación secundaria de bivalentes de cromosomas genéticamente equivalentes (homeólogos). Kempanna y Riley (1964) demostraron que el fenómeno de asociación secundaria en *Triticum aestivum* dependía de la afinidad genética de los bivalentes asociados. Por su parte Lacadena y Pueras (1969) demostraron, mediante análisis estadísticos la existencia de asociación secundaria en *Aegilops triaristata* ($6x$).

Por último Molina y Naranjo (1987) se basaron en la existencia de asociación secundaria de bivalentes, entre otros datos citogenéticos, para postular su hipótesis de la condición anfiploide del maíz ($2n=20$) y que $x=5$ sería el número básico del mismo.

Son estas, las primeras evidencias citológicas que se presentan en apoyo a la existencia de un número básico $x=8$ en el género *Amaranthus*.

La determinación del número cromosómico básico es, obviamente, un paso importante en el establecimiento de una hipótesis evolutiva. Algunas veces la mayoría de las especies poliploides pueden, actualmente, presentar un comportamiento diploidizado (Darlington, 1956).

Existen opiniones contradictorias sobre las relaciones genómicas entre las especies *A. spinosus* ($n=17$) y *A. dubius* ($n=32$). Grant (1959b) fue de la opinión de que *A. spinosus* es posiblemente un progenitor de *A. dubius*, y propone que existe un apareamiento alosindético entre el complemento haploide ($n=17$) de *A. spinosus* y 17 de los 32 cromosomas de *A. dubius*, quedando 15 cromosomas de *A. dubius* como univalentes. Pal (1972) en base al estudio del híbrido triploide (hexaploide) y del hexaploide (dodecaploide) obtenido por tratamiento del triploide con colchicina, contradice la hipótesis de Grant (1959b) sugiriendo que *A. spinosus* no pudo ser uno de los progenitores de *A. dubius* y postula que existiría apareamiento autosindético entre cromosomas homeólogos del genoma de *A. dubius*, y que los univalentes serían del genoma de *A. spinosus*. Behera y Patnaik (1982) estudiando el híbrido triploide F1 *A. spinosus* \times *A. dubius* y su correspondiente anfiploide artificial sugieren la existencia de ambos tipos de apareamiento. Los resultados obtenidos en el presente estudio del híbrido triploide F1 entre *A. dubius* y *A. spinosus* (Fig. 2f; Tabla 1) muestran que la configuración meiótica más frecuente es $17II + 15I$ con un máximo de $20II + 9I$. Estos resultados coinciden con los encontrados por Behera y Patnaik (1982). *A. dubius* sería, por lo tanto, un alooctoploide que se

habría estabilizado en $2n=64$ por procesos de aneuploidía, siendo *A. spinosus* uno de sus progenitores.

Sobre la base de las configuraciones meióticas de los híbridos estudiados en el presente trabajo, se postulan las formulas genómicas de las especies involucradas (Tabla 9). De acuerdo con Stebbins (1971), los genomas están representados por una letra mayúscula (A, B y C). Se denominó arbitrariamente como A y B a los genomas $x=8$ de *A. quitensis*. Con la intención de expresar pequeñas diferencias entre genomas, las letras están acompañadas por diferentes subíndices. Esta nomenclatura indica homeología entre genomas, a pesar de la existencia de pequeñas diferencias génicas y/o estructurales, las cuales están involucradas en la reducción de la viabilidad del polen. La presencia de univalentes en los híbridos en los que *A. spinosus* es un de los progenitores, sugiere que esta especie posee un genoma de 9 cromosomas algo diferente al del resto de las especies analizadas.

La determinación de las fórmulas genómicas de las especies y el comportamiento meiótico de los híbridos, además de contribuir al conocimiento taxonómico y evolutivo del género, podrían ser importantes en estudios de mejoramiento en los cuales se pretenda utilizar especies silvestres como fuentes de variabilidad.

Tabla 8. Número cromosómico y fertilidad de los híbridos interespecíficos del género *Amaranthus* estudiados hasta el momento

Híbrido	2n	Fertilidad	Observaciones	Autor
<i>A. caudatus</i> x <i>A. hybridus</i>	32		inviable	Pal, 1972; Pal y Khoshoo, 1973
<i>A. caudatus</i> x <i>A. hypochondriacus</i>	32	E	inviable	Pal y Khoshoo, 1972, 1973a
<i>A. caudatus</i> x <i>A. hypochondriacus</i>		E		Gupta y Gudu, 1991
<i>A. cruentus</i> x <i>A. hybridus</i>	34			Grant, 1959c
<i>A. cruentus</i> x <i>A. retroflexus</i> x <i>A. powellii</i>	32			Grant, 1959c
<i>A. edulis</i> x <i>A. hypochondriacus</i>	32	E		Pal y Khoshoo, 1972, 1973a
<i>A. edulis</i> x <i>A. hybridus</i>	32		inviable	Pal, 1972; Pal y Khoshoo, 1973a
<i>A. edulis</i> x <i>A. caudatus</i>	32	S		Pal, 1972; Pal y Khoshoo, 1973a
<i>A. gracilis</i> x <i>A. tricolor</i>	34	E		Pal y Khoshoo, 1973
<i>A. graecizans</i> x <i>A. tricolor</i>	34	E		Pal y Khoshoo, 1973
<i>A. hybridus</i> x <i>A. hypochondriacus</i>	33	S		Pal, 1972; Pal y Khoshoo, 1973
<i>A. lividus</i> x <i>A. tricolor</i>	34	E		Pal, 1972; Pal y Khoshoo, 1973
<i>A. graecizans</i> x <i>A. lividus</i>		E	flores no desarrolladas	Pal y Khoshoo, 1973
<i>A. viridis</i> x <i>A. blitum</i>			Estudios morfológicos	Coons, 1981
<i>A. caudatus</i> x <i>A. cruentus</i>			inviable	Gupta y Gudu, 1991
<i>A. hypochondriacus</i> x <i>A. cruentus</i>		E		Gupta y Gudu, 1991
<i>A. powellii</i> x <i>A. hypochondriacus</i>	33	E		Pal, 1972; Pal y Khoshoo, 1973
<i>A. spinosus</i> x <i>A. dubius</i>	49	E		Grant, 1959b
<i>A. spinosus</i> x <i>A. dubius</i>	49	E		Pal, 1972
<i>A. spinosus</i> x <i>A. dubius</i>	49	E		Behera y Patnaik, 1982

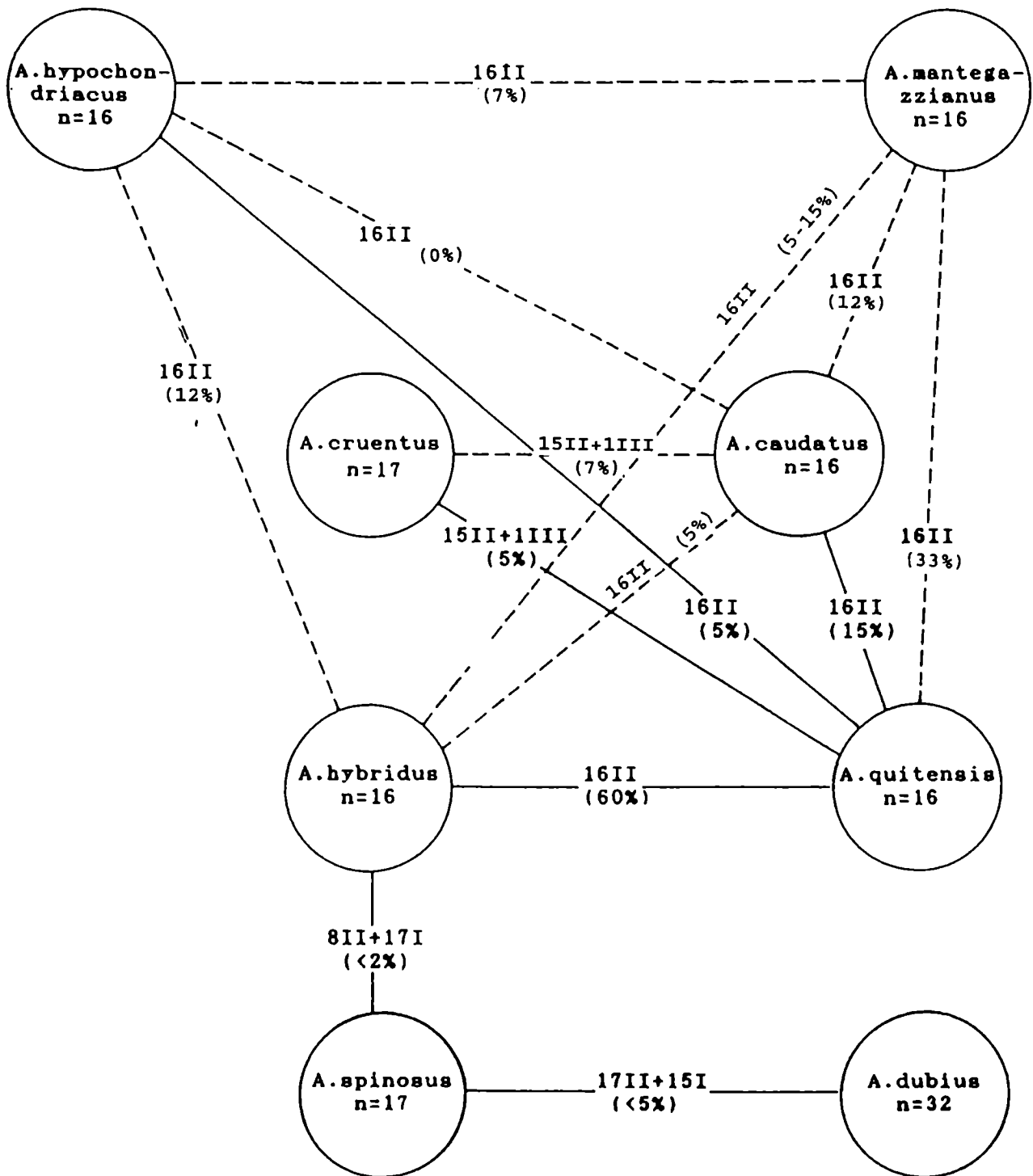
E=estéril, S=semifértil

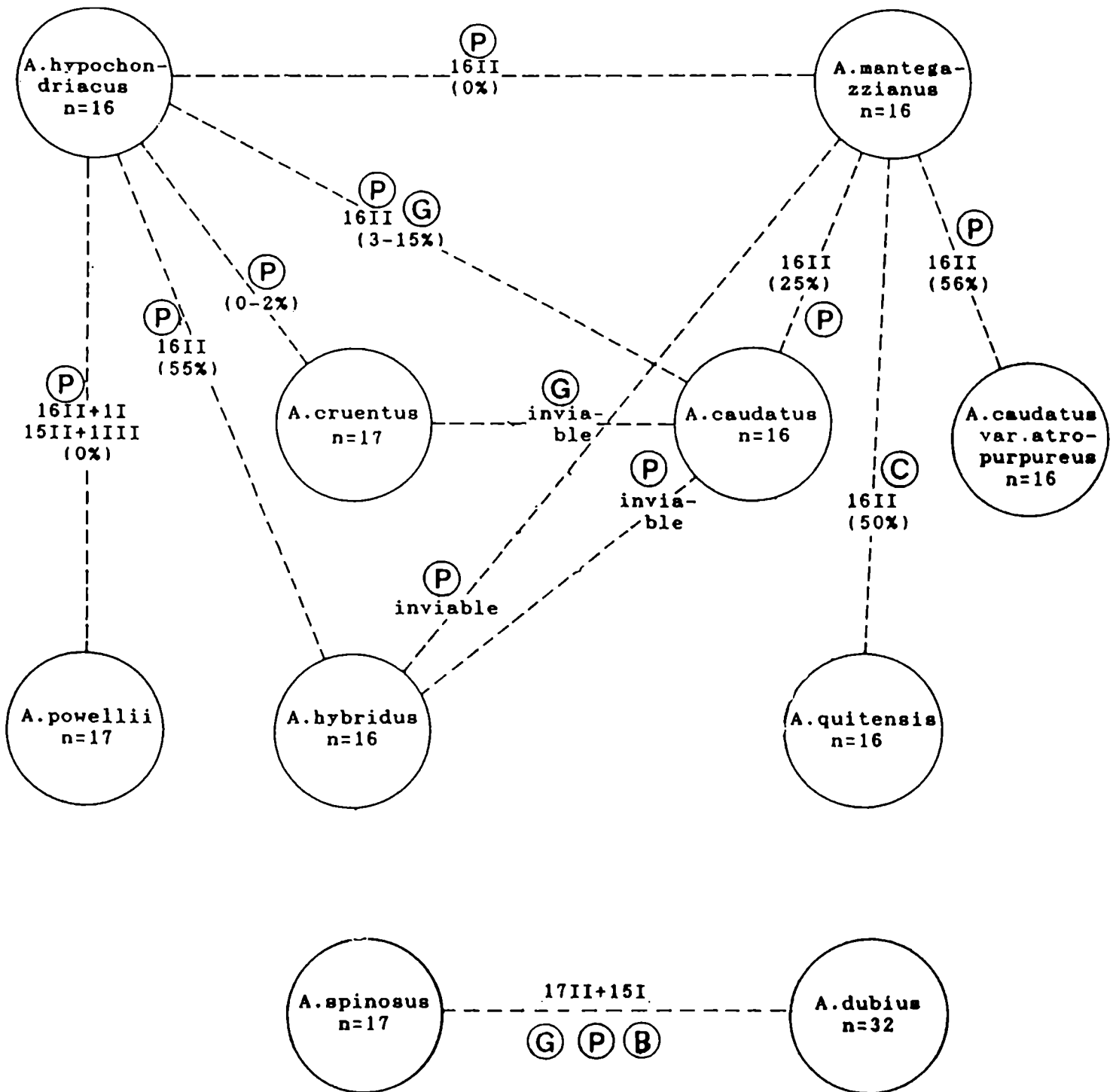
Tabla 9. Fórmulas genómicas propuestas para las especies estudiadas del género.

Especie	Formula Genómica
<i>A. quitensis</i>	AA BB
<i>A. caudatus</i>	A1A1 B1B1
<i>A. cruentus</i>	A2A2 B2B2 (B2: x=9)
<i>A. mantegazzianus</i>	A3A3 B3B3
<i>A. hypochondriacus</i>	A4A4 B4B4
<i>A. hybridus</i>	A5A5 B5B5
<i>A. spinosus</i>	A6A6 CC (C: x=9)
<i>A. dubius</i>	A7A7A6A6 B6B6 CC

Figura 24: A= Estudios citogenéticos en híbridos realizados en el presente trabajo

B= Estudios citogenéticos en híbridos realizados por otros autores.
P=Pal y Khoshoo, 1972; G=Grant, 1959; C= Covas comunicación personal; B= Behera y Paitnaik, 1977.





III. ESTUDIOS ELECTROFORETICOS

1. INTRODUCCION

La utilización de los perfiles de proteínas seminales, obtenidos por electroforesis, en estudios taxonómicos y evolutivos han tenido gran expansión en los últimos años (Lennart Johnson y Hall, 1965, Vaughan y Denford, 1968, Levin y Schaal, 1970, Lennart Johnson, 1972, Caldwell y Kasarda, 1978, Gonzalez Aguilera *et al.*, 1986, Datta *et al.*, 1987, Hueros *et al.*, 1988, Jouvé *et al.*, 1990, Tercero *et al.*, 1991, Tomooka *et al.*, 1992, de la Rosa y Jouvé, 1992, Lanham *et al.*, 1994).

La razón de su utilización es que las proteínas tienen ciertas ventajas sobre otras macromoléculas desde el punto de vista evolutivo ya que la selección natural opera sobre el fenotipo (representado en este caso por las proteínas) más que sobre el DNA. Si bien las técnicas aplicadas al DNA, tales como los RLFP están en expansión, las proteínas tienen importancia como productos post-transcripcionales y traduccionales del DNA de un organismo (Harborne y Turner, 1984). Son, además, productos primarios de los genes, es decir, que éstos a través de la transcripción y transducción conducen a la formación de proteínas enzimáticas y estructurales. Por lo tanto, los perfiles electroforéticos representan una medida de las similitudes y diferencias entre las plantas comparadas.

Las distintas proteínas producidas por un organismo difieren unas de otras por su composición, es decir la secuencia de aminoácidos, lo que determina su

estructura primaria. Esto determina que cada proteína tenga una longitud característica y una carga electrostática neta que variará según el medio en que se halle. La estructura secundaria depende de las estructuras covalentes y de los puentes de hidrógeno y disulfuro, los cuales hacen que las proteínas adopten distintas formas tridimensionales lo que determina la estructura terciaria de las mismas. Asimismo, la molécula proteica puede estar compuesta por una o más cadenas, cada una de las cuales se denomina subunidad proteica. La forma en que se unen dichas subunidades constituye la estructura cuaternaria de las proteínas. Las diferencias en tamaño, forma y carga neta son herramientas útiles en la caracterización de los distintos tipos de proteínas.

La preferencia de la utilización de las proteínas seminales por sobre las que contienen otros tejidos es que las primeras son estables, son poco o nada afectadas por el medio ambiente o factores estacionales. Además, como las semillas son ricas en proteínas, esto permite que se puedan usar en forma individual, en estudios poblacionales. Las proteínas de hoja, por el contrario, son mucho más influenciadas por el ambiente y por lo tanto mucho más variables. Ello las hace más convenientes para el estudio a nivel isoenzimático. Los granos de polen también son ricos en proteínas y por ello han sido ocasionalmente utilizados en estudios comparativos. Sin embargo, las proteínas que contienen no son tan estables como las de semilla. Por ejemplo Johnson y Fairbrother (1975) encontraron que en *Betula populifolia* algunas de las bandas encontradas en el polen fresco, desaparecen en el polen que ha sido guardado por cierto tiempo. En ciertas plantas, por ejemplo especies arbóreas, en las cuales no es posible la obtención de semillas en individuos de pocos años, es posible

la utilización de tejido radicular. Por ejemplo, Huang et al. (1975) obtuvieron buenos patrones de bandas de proteínas provenientes de extractos de raíz de 41 individuos del árbol *Robinia pseudacacia*.

La electroforesis de proteínas seminales es una técnica comúnmente empleada para la obtención de datos de valor taxonómico a partir de macromoléculas y este método se está volviendo de uso corriente en la sistemática vegetal. El motivo de ello es que el análisis de las proteínas de reserva mediante electroforesis es rápido, sencillo, requiere muestras pequeñas y aparatos poco costosos.

La técnica se basa en la migración diferencial de las moléculas proteicas a través de un medio soporte cuando son sometidas a un campo eléctrico. Debido a que el desplazamiento de las moléculas depende de su carga eléctrica neta y de su forma y tamaño, cualquier cambio en un aminoácido en una proteína producirá una alteración en su migración.

Las técnicas electroforéticas fueron utilizadas por primera vez por Tiselius en 1937 para distinguir distintas fracciones de proteínas séricas a través de una solución (Avisé, 1975). Más tarde se desarrollaron las técnicas en geles de almidón (Smithies, 1955), de poliacrilamida (Raymond y Weintraub, 1959) y la de SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

En general se considera que las proteínas de diferentes individuos, poblaciones y especies son homólogas, si tienen la misma movilidad en una gel y producen bandas de la misma intensidad y del mismo grosor, luego de teñidas. Por lo tanto los perfiles representarían una medida de las similitudes y diferencias entre las plantas comparadas (Crawford y Julián, 1976).

La utilidad de los espectros electroforéticos de proteínas seminales en estudios taxonómicos y evolutivos fue analizada y destacada por Ladizinsky y Hymowitz (1979) quienes analizan los aportes que se hicieron desde los aportes pioneros de Hall (1964) y Hunziker (1967), entre otros hasta la fecha de su revisión. Una de las características más importantes de la electroforesis de proteínas seminales es la estabilidad de las proteínas de semillas maduras ante cambios ambientales y estacionales y su constancia a través del tiempo de conservación de las semillas. (Ladizinsky y Hymowitz, 1979; Gray et al., 1973). Plantas cultivadas provenientes de diferentes áreas geográficas y adaptadas a diversos ambientes poseen esencialmente los mismos perfiles (Ladizinsky, 1975; Ladizinsky y Adler, 1975; Johnson, 1972). En diferentes grupos de plantas se ha visto que cada especie se caracteriza por un perfil electroforético determinado, con presencia de bandas propias, como ha sido observado, por ejemplo en *Bulnesia* (Comas et al., 1979, 1984). Otros géneros, como por ejemplo *Prosopis* presentan gran variación intraespecífica en sus perfiles electroforéticos y las entidades se pueden caracterizar por las frecuencias relativas de las diferentes bandas de los perfiles (Burghardt y Palacios, 1984). Otra característica de los perfiles proteicos es la aditividad, es decir, que los perfiles provenientes de individuos híbridos interespecíficos muestran la suma de las bandas de los perfiles provenientes de los individuos parentales. Cada banda individual se trata como un carácter discreto ya que se forma como un producto génico directo. Esta característica es muy útil para la detección de progenitores de individuos híbridos F_1 . La propiedad de aditividad de los perfiles de proteínas de reserva fue utilizada para la confirmación del origen del

alotetraploide de *Aegilops cylindrica* a partir de las especies diploides *A. caudata* y *A. squarrosa* (Johnson, 1972). La electroforesis de proteínas de reserva también se ha utilizado conjuntamente con datos citogenéticos, de este modo se ha corroborado el origen del algodón tetraploide, *Gossypium hirsutum* (Cherry et al., 1970, 1971). En todos los casos, ha sido una poderosa herramienta para rastrear complejos problemas evolutivos y diferenciar diploides y auto y alopoliploides. Recientemente el desarrollo de esta técnica permitió el análisis de la variación intra e interpoblacional en los géneros *Prosopis* (Burghard, 1992) y *Bulnesia* (Comas, 1993).

Los datos obtenidos mediante el estudio de los patrones electroforéticos de las proteínas seminales constituyen una herramienta útil para ser utilizada conjuntamente con otras técnicas utilizadas en biosistemática.

En el género *Amaranthus* la utilización de la electroforesis de proteínas se ha utilizado primordialmente con el objetivo de caracterizar los componentes proteicos de las especies cultivadas. Así, Segura-Nieto *et al.* (1992) realizaron estudios de electroforesis de proteínas seminales por SDS-PAGE y electroforesis bidimensional en *A. hypochondriacus* tipo Azteca con la finalidad de analizar los procesos involucrados en la síntesis de las proteínas de reserva.

Las técnicas moleculares modernas, tales como RAPD y RFLP, permiten actualmente encarar la resolución de muchos problemas y, en algunos casos, con gran resolución ya que se analiza directamente la variación en el DNA. Estas técnicas suelen tener un costo elevado y requieren de laboratorios especialmente equipados. A nivel poblacional muchos problemas pueden ser

encarados con técnicas más simples y menos costosas, tales como la electroforesis de proteínas seminales. Estos casos serían, por ejemplo,

a)Utilización de la electroforesis de proteínas seminales en la caracterización de poblaciones, especies y cultivares.

La electroforesis de proteínas seminales ha sido utilizada en más de 45 géneros de plantas y los perfiles de bandas obtenidos son una caracterización específica de la especie (Ladizinsky y Hymowitz, 1979).

En la mayoría de los estudios electroforéticos, para la obtención de suficiente cantidad de proteína, se reúnen las semillas de la misma o de distintas plantas. Esto es una limitación para los estudios intrapoblacionales, pero no para los estudios interpoblacionales o interespecíficos. En el caso de que el tamaño de la semilla lo permita, se utilizan a éstas en forma individual (Payne, 1976; Shewry et al., 1978; Comas et al., 1979; Nevo, 1983). En estos casos es posible la utilización de la electroforesis de proteínas en estudios intrapoblacionales. En plantas autógamas se pueden realizar estudios interpoblacionales utilizando todas las semillas de un individuo ya que todas las semillas provenientes de cada planta serían idénticas y con alto grado de homocigosis.

El perfil electroforético dentro de un género puede constituir un patrón único como lo informado por Hunziker (1967; 1971) en *Agropyron* y *Larrea* o puede existir variaciones interespecíficas en el número, movilidad e intensidad de las bandas (Ladizinsky y Hymowitz, 1979; Harborne y Turner, 1984). Ejemplos de esto son los patrones electroforéticos en *Solanum* (Desborough y Peloquin, 1966), en *Narcissus* (Gonzalez Aguilera et al., 1986) y *Capsicum* (Panda et al., 1986).

Estudios intrapoblacionales, utilizando semillas individuales fueron realizados por Nevo et al. (1983), los cuales estudiaron la distribución de hordeínas a través de una transecta en una población de *Hordeum spontaneum* (cebada silvestre). También Payne (1976) realizó estudios poblacionales en *Ambrosia trifida*.

Los estudios de variabilidad intraespecífica basados en la electroforesis de proteínas de semilla no son muy abundantes en la literatura. A nivel de estudios de poblaciones naturales Gray et al. (1973) en el complejo *Danthonia sericea* señala la importancia que tiene el análisis de la variabilidad intraespecífica en los estudios sistemáticos. En la especie *Opuntia humifusa* Wallace y Fairbrothers (1986) no encuentran variación intrapoblacional pero sí entre poblaciones. Crawford (1974) y Crawford y Julian (1976) encontraron diferencias entre pares de poblaciones del género *Chenopodium*. También Comas et al (1984) informaron variaciones interpoblacionales en *Bulnesia retama*. Por el contrario, existen varios trabajos realizados en diversas especies cultivadas, tales como *Vicia* (Wolff, 1980), *Capsicum* (Panda et al., 1986), *Nigella sativa* (Datta et al., 1987). Estos trabajos indican que, en general, existen diferencias en los patrones electroforéticos entre los cultivares, lo cual representa una gran ayuda a los mejoradores, ya que permite la rápida caracterización de los cultivos utilizados.

b) Utilización de la electroforesis de proteínas en el estudio de híbridos y poliploides

Los perfiles electroforéticos han sido utilizados para la identificación de los progenitores diploides de especies poliploides. Este método es de considerable

valor, si los posibles progenitores diploides producen perfiles proteicos únicos, ya que los poliploides derivados, a menudo, muestran patrones aditivos simples (Vaughan y Waite, 1967; Johnson y Thien, 1970; Cherry et al., 1970; Edmonds y Glidewell, 1977).

Comas (1993), señala algunas conclusiones generales que se desprenden del estudio electroforético de proteínas de reserva. Entre ellas se destacan:

- 1) El perfil proteico a partir de semillas es, en general, característico de cada especie; las categorías por debajo del nivel de especie tienden en general, a compartir el mismo perfil. Los resultados pueden ser usados, en muchos casos, para delimitar especies.
- 2) Cuando existe hibridación, esta es generalmente revelada por herencia aditiva de las proteínas seminales a partir de sus progenitores, aunque algunas pueden perderse.
- 3) Los antecesores silvestre de un cultivar pueden ser revelados a través de sus perfiles proteicos. Cuando ellos están directamente relacionados, el antecesor silvestre puede compartir el perfil proteico del cultivar. La fuerte selección realizada por el hombre para ciertos caracteres asociados con la domesticación puede producir cambios fenotípicos rápidos sin cambios en los loci (Crawford, 1989).

2. MATERIALES UTILIZADOS

A. caudatus L. cv Linea 120, leg. G. Covas;- cv "Love lies bleeding", leg. G. Covas; - lotes de semillas individualizadas G10 a G25, leg. J. Gesumaría.

A. cruentus L. cv IFSC, leg. E. Greizerstein; -cv Don Armando, leg. G. Covas; - cv Don Giem, leg. G. Covas; material proveniente de Morelos, Mexico, leg. G. Covas.

A. hypochondriacus L. cv Artasa, leg. G. Covas; -cv IFSC, leg E. Greizerstein; -cv 309 (semilla negra), Leg E. Greizerstein -lotes de semillas individualizadas G1 a G10, leg J. Gesumaría

A. mantegazzianus Passer. cv Don Manuel, leg. G. Covas; -cv Don Juan, leg G. Covas; -material proveniente de cultivos experimentales en la UNRío IV, Cdba, leg. J. Gesumaría.

A. spinosus L. cv IFSC, leg. E. Greizerstein; -lotes de semillas individualizadas G1 a G10, Leg. J. Gesumaría.

En los lotes de semillas legados por el Ing. J. Gesumaría, cada número corresponde a las semillas recogidas de una sola planta.

3. METODOS

3.1. Tecnicas electroforéticas

La técnica utilizada fue la Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamina con Dodecilsulfato de Sodio (SDS-PAGE). Se ha aplicado una adaptación de la desarrollada por Laemmli (1970) y la utilizada en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de Alcalá de Henares, España.

Esta técnica se basa en que la electroforesis analítica de proteínas se lleva a cabo en geles de poliacrilamina bajo condiciones que aseguren la disociación de las proteínas en sus polipéptidos individuales y que además minimice la posibilidad de agregación de los mismos.

El detergente aniónico SDS se utiliza conjuntamente con un agente reductor y ayuda a la disociación de las proteínas antes de que las mismas se carguen en el gel. Los polipéptidos se unen al SDS y se cargan negativamente. Debido a que la cantidad de SDS que se une al polipéptido es proporcional a su peso molecular e independiente de su secuencia, el complejo SDS-polipéptido migra a través del gel de poliacrilamida de acuerdo al tamaño del mismo e independientemente de su carga eléctrica.

La electroforesis se lleva a cabo en un sistema discontinuo de buffers en el cual el buffer en los reservorios es de distinto pH y fuerza iónica de aquél que se utiliza para la fabricación del gel de corrida. Se utiliza un gel concentrador (stacking) y un gel separador (resolving). Después de migrar a través del gel concentrador, de alta porosidad, los complejos SDS-polipéptidos son depositados en una zona muy delgada en la superficie del gel separador. La capacidad

de los sistemas de buffers discontinuos para concentrar todos los complejos en un volúmen muy pequeño incrementa mucho la resolución del método.

Los sistemas de buffer discontinuo fueron originalmente desarrollados por Ornstein (1964) y Davis (1964). Las muestras y el gel concentrador contienen buffer Tris-HCl (pH 6,8), los reservorios superior e inferior de las cubas contienen buffer Tris-Glicina (pH 8,3) y el gel separador contiene Tris-HCl (pH 8,8). Todos los componentes del sistema contienen SDS al 0,1% (Laemmli, 1970).

Los iones Cl^- en las muestras y en el gel concentrador son los iones rápidos que lideran el movimiento de los complejos, mientras las moléculas de glicina se ubican detrás de los complejos. Entre ambos se produce una zona de baja conductividad y un gradiente de voltaje que conducen a los complejos y los depositan en la superficie del gel separador. Allí el alto pH del gel favorece la ionización de las moléculas de glicina y las moléculas ionizadas viajan a través de los complejos y migran en el gel separador inmediatamente detrás de los iones Cl^- . Los complejos SDS-polipéptidos se mueven, en el gel separador en un medio de pH y voltaje uniforme y son separados de acuerdo a su tamaño independientemente de su carga neta.

Los geles de poliacrilamida están compuestos por dos monómeros: acrilamida y bisacrilamida (N,N'-metilenbisacrilamida). La polimerización es mediante radicales libres, tales como el persulfato de amonio que actúa como catalizador y el cual necesita una base cuaternaria (Temmed) para iniciar la polimerización

Nuestro trabajo está realizado en geles de acrylamida al 10% o 17,5% y para determinar la cantidad óptima de bis se utiliza la siguiente fórmula: Bis

(mg/100ml= 1300/acrilamida (g/100ml), lo cual significa que nuestro gel de siembra (3%) está más fuertemente entrecruzado que el gel principal en la proporción de la acrilamida presente.

3.1.1. Reactivos para preparar el gel

1) 1M Tris pH 8.8 (500ml)

Disolver 60.55 g de TRIZMA BASE en aproximadamente 250 ml de H₂O destilada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado. Llevar a 500 ml con H₂O destilada.

2) 1M Tris pH 6.8 (100ml)

Disolver 12.11g de TRIZMA BASE en alrededor de 50ml de H₂O destilada. Ajustar el pH a alrededor de 7.0 con HCl concentrado. Enfriar a temperatura ambiente y luego ajustar el pH a 6.8 con HCl 1N. Llevar a 100ml con H₂O destilada. El pH 6.8 del buffer Tris es crítico para la buena calidad del gel.

Ambos bufferes pueden guardarse en el congelador por alrededor de un mes, pero el de pH 6.8 debe ser comprobado regularmente pues tiende al derivar.

3) Acrylamida 35% peso/volumen (p/v)

175g Acrylamida/500ml H₂O dest.

140g Acrylamida/400ml H₂O dest.

4) NN-Methylene-Bis-Acrylamida 2% p/v

4g Bis/200ml H₂O dest.

5) SDS 10% p/v especially pure grade

10g SDS/100ml H₂O dest.

6) Persulfato de amonio

0,25g/25mlH₂O dest. se hace en el momento de usarlo

7) TEMED

3.1.2. Método para hacer el gel

Se vierte el gel principal hasta una altura de un centímetro por debajo de donde será colocado el "peine" en la parte superior del gel. Se deja deslizar el gel desde una pequeña columna con un tubo vertedor con un clip. Luego se agrega una capa de agua destilada que se vierte en varios puntos a lo largo de la superficie del gel usando una jeringa hasta que se forma una capa de 2cm. Se deja que el gel gelifique hasta el día siguiente. Se vuelca el liquido libre, se lava con agua destilada. Se agrega algo del gel de siembra previamente desgasificado (después de la adición de SDS y los activadores). Se vuelca el líquido libre. Se coloca el "peine" en posición y se vuelca el gel de siembra. Esta es la mejor forma de hacer el gel para que no se formen burbujas de aire debajo de los dientes del peine.

3.1.3. Reactivos para la electroforesis

1) Buffer para electroforesis (5 litros)

Glycina75,55 g

Tris (Trizma Base).....15,00 g

SDS..... 5,00 g

H₂O dest.....hasta. 5,00 l

El pH debe aproximarse a 8.3. Al principio puede ser mayor pero baja en un día o dos. No es crítico que el pH sea exacto, pero si es necesario agregar un poco de HCl.

Se puede guardar, pero debe ser agitado antes de usarse para redissolver el SDS que pueda haber precipitado.

2) Buffer 3x Solución stock para hacer el buffer de siembra.

Dentro de una probeta de 50ml colocar:

Glycerol.....10.00 ml

1M Tris pH 6.8..... 6.25 ml

H₂O dest.....12.05 ml

SDS sólido..... 2.00 g

Pyronin10,00 mg

Disolver los sólidos y agregar la mezcla al glicerol

Esta solución stock es estable a temperatura ambiente por varios meses.

3.1.4. Preparación de las muestras para la siembra

Buffer de siembra:

Inmediatamente antes de usar, mezclar 3x bufer de siembra con mercaptoetanol y agua destilada en las siguientes proporciones:

No de muestras	H ₂ O dest.	3x	mercaptoetanol
14	4.0 ml	1.70 ml	0.30 ml
20	6.0 ml	2.55 ml	0.45 ml
30	8.0 ml	3.40 ml	0.60 ml
40	12.0 ml	5.10 ml	0.90 ml
80	24.0 ml	10.20 ml	1.80 ml

3.1.5. Preparación de las muestras

Las proteínas de semillas fueron obtenidas a partir de la molienda de semillas. Debido al pequeño tamaño de las mismas y aprovechando el hecho del

alto porcentaje de autogamia de los amarantos, se utilizaron más de una semilla proveniente de cada individuo (8-10) para la obtención de harina. Se asumió que todas las semillas provenientes de un mismo individuo contenían la misma información.

Las muestras se pesaron en tubos ependorff. Se mezclaron 8 mg de grano molido con 0,2 ml de buffer. Se agitaron, por medio de un vortex, varias veces a temperatura ambiente durante una hora y luego se incubaron a 100°C por 2 minutos. Antes de sembrarlas se las centrifugó 10 minutos a 10.000g.

3.1.6. Marcadores de Peso Molecular

Para preparar el marcador de peso molecular se hacen las siguientes soluciones stock:

Fosforilasa b	0.5 mg/250 µl buffer	PM: 97.000
Anhidrasa carbónica	5.0 mg/2.50 ml buffer	PM: 29.000
Albúmina bovina	25.0 mg/12.5 ml buffer	PM: 66.000
Albúmina huevo	25.0 mg/12.5 ml buffer	PM: 45.000

Se mezclan 250 µl de c/u y se guardan a -20°C. En cada gel se siembran 8µl.

3.1.7. Siembra de las muestras

El volúmen de cada muestra que se carga en la micropipeta se calcula según la siguiente tabla:

No de muescas	volúmen de c/muestra (ml)
14	50
20	40
32	20
40	10

Se colocaron las muestras en una micropipeta y se sembraron en las muescas dentro del gel de siembra.

3.1.8. Preparación del gel para la electroforesis

Se quita con cuidado el peine de la parte superior del gel y se lava dos veces con el buffer de corrida. Se quitan las grampas y el espaciador. Se ajusta el gel a la cuba. Se llenan los reservorios hasta un nivel justo por debajo de donde llegan las muescas en donde serán sembradas las muestras, luego se siembran las muestras. El reservorio superior se llena completamente una vez que las muestras han entrado en el gel. La corriente a la cual se corren las muestras no parece ser crítico, 20mA funciona bien.

3.1.9. Condiciones de corrida

Se corrieron los geles a 10mA durante toda la noche (aproximadamente 11 hs).

3.1.10. Tinción del gel

Se quita el gel del vidrio y se lo deja caer dentro de la cuba de teñido y se le agrega 1000 ml de solución de tinción.

Primer teñido del gel

La solución de teñido se prepara a partir de una solución stock:

Coomassie blue R.....2 g

Etanol 95%.....500 ml

Se deja reposar toda la noche, luego se filtra y se guarda en la oscuridad.

Para hacer 1000 ml de solución de teñido:

Tricloroacético al 10% p/w.....600 ml

H₂O dest.....350 ml

Solución stock de Coomassie blue R..... 50 ml

La concentración final:

Coomasie blue R.....0.02%

Etanol.....5%

TCA.....6%

Se deja teñir de 2 a 5 días. La solución de teñido se usa una sola vez. Se tira la solución de teñido y se la reemplaza por agua destilada durante 1-2 días. Se tira el agua y se lo reemplaza por la Tinción de Blakesley por 1 día. Se destiñe en agua destilada.

Segundo teñido del gel

Tinción de BLAKESLEY

Se la utiliza para geles ya desteñidos; una vez que han estado en agua destilada, se retira este y se puede utilizar a continuación esta tinción. Tiene la ventaja de depositarse únicamente sobre las proteínas, quedando así más intensificadas las bandas.

Tinción de Blakesley:

Coomassie blue G.....0,4 g

H₂O dest.....200 ml

a esta mezcla agregar:

SO₄H₂ 2N.....200 ml (10,8 ml de SO₄O₂ conc. en 200 ml de H₂O dest.) Se deja reposar toda la noche.

Al día siguiente:

KOH 10N.....44,4 ml (24,6 g KOH en 44,4 ml H₂O dest)

Filtrar

Acido Tricloroacético.....55,6 g

Los geles así teñidos, pueden llevarse sobre agua destilada, con lo que las bandas se intensifican aún más.

3.1.11. Conservación de los geles

Solución conservadora de geles

Etanol absoluto..... 125 ml

Acido acético..... 40 ml

H₂O dest.....335 ml

luego se agrega

Glicerol..... 5 ml

3.2. Técnicas Numéricas

Se entiende por técnicas numéricas a la rama de la taxonomía numérica que, mediante operaciones matemáticas, calcula la afinidad entre unidades taxonómicas en base al estado de sus caracteres. El uso de las técnicas no implica, necesariamente, una aceptación total de los principios del feneticismo (Crisci y López Armengol, 1983).

Los pasos elementales comunes a casi todas las técnicas numéricas son los siguientes:

a) Elección de las unidades operativas.

El primer paso en cualquier proceso clasificatorio consiste en elegir las unidades a clasificar, es decir las OTU. Esta sigla proviene de la denominación en inglés: "Operational Taxonomic Unit" (Sneath y Sokal, 1973). En idioma español se han propuesto otras siglas, pero dada la enorme difusión de la sigla OTU se mantiene su uso.

Las especies y cultivares constituyeron las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs).

b) Elección de los caracteres

Se eligen los caracteres que describan a las OTU y se registra el estado de los caracteres presentes en ellas.

Los caracteres utilizados fueron las bandas obtenidas de los patrones electroforéticos de los materiales utilizados.

Los datos utilizados se tipifican como doble estado: presencia/ausencia y su codificación fue, de acuerdo con Crisci y López Armengol (1983): presencia=1; ausencia=0.

c) Matriz Basica de Datos

Los datos se presentan en forma de cuadro o tabla denominada Matriz Básica de Datos. Esta es una matriz de $n \times t$ donde n columnas representan los caracteres y las t filas representan las OTUs. Cada casillero de la matriz x_{ij} representa el valor del caracter i en la OTU j .

d) Estimación del parecido taxonómico: Coeficientes

El parecido o similitud es cuantificable aplicando un coeficiente de similitud. Con el uso de estos coeficientes en operaciones matemáticas pueden calcularse las similitudes o las diferencias respecto a cada par posible de OTUs de una matriz básica de datos (Crisci y López Armengol, 1983). De los varios coeficientes existentes en la bibliografía se han elegido algunos, primordialmente los que utilizan datos doble estado (presencia-ausencia)

a) Coeficientes de distancia

Mean Character Difference (MCD), propuesto por Cain y Harrison (1958) y se expresa como la sumatoria del valor absoluto de la diferencia entre cada estado de los caracteres de las OTU, dividido por el número de caracteres. Este es un coeficiente que se aplica a datos doble estado.

b) Coeficientes de asociación

Estos coeficientes miden las coincidencias y diferencias en los estados de los caracteres de las OTUs. Esta medición exige datos del tipo doble estado.

En este trabajo se ha elegido como coeficiente de asociación el de Jaccard.

Los valores de similitud obtenidos a partir de la aplicación de este coeficiente varían entre 0 (mínima similitud) y 1 (máxima similitud).

e) Matriz de Similitud

Los resultados obtenidos de la aplicación de los coeficientes de similitud para los pares posibles de OTUs, ordenados en forma de tabla, constituyen la matriz de similitud.

f) Análisis de agrupamientos

El análisis de agrupamientos comprende técnicas que forman grupos de OTU que se asocian por su grado de similitud.

Existen numerosas técnicas de análisis de agrupamientos, de las cuales las más usadas son las exclusivas, jerárquicas, aglomerativas y secuenciales, las que se combinan caracterizando a las técnicas de agrupamientos que se detallarán a continuación.

a) Ligamiento simple: Las OTU se incorporan a grupos o núcleos ya formados tomando en cuenta que el valor de similitud entre la OTU candidato a in-

corporarse y el grupo o núcleo es igual a la similitud entre el candidato y la OTU integrante del grupo o núcleo más parecido a ella.

b) Ligamiento completo: En este caso, se considera que el valor de similitud entre la OTU candidato a incorporarse y el grupo o núcleo es igual a la similitud entre el candidato y la OTU integrante del grupo o núcleo menos parecido a él.

c) Ligamiento promedio: En este caso se considera que el valor de similitud entre la OTU candidato a incorporarse y el grupo o núcleo es igual a una similitud promedio resultante de los valores de similitud entre el candidato y cada uno de los integrantes del grupo o núcleo. Como existen más de una media, es posible contar con más de una técnica de ligamiento promedio. La más utilizada, y la que hemos utilizado en el presente trabajo, es la media aritmética no ponderada (UPGMA).

Todos los análisis multivariados de relaciones entre especies y cultivares fueron realizados mediante el Programa NTSYS-pc versión 1.7 (Rohlf, 1993).

4. RESULTADOS

4.1. Electroforegramas

Se estudiaron electroforéticamente cinco especies del género *Amaranthus*, cuatro de ellas graníferas. Dentro de cada especie se estudiaron varios cultivares. y dentro de cada cultivar se estudiaron por lo menos 10 individuos. Para poder hacer comparativos los resultados obtenidos en cada corrida, se sembraron también, junto con los individuos de la especie a estudiar, tres calles con un individuo representativo de las otras especies en cada una. También se sembró una calle con trigo "Chinese Spring" como testigo y otra calle con los marcadores de peso molecular.

En las figuras 25 a 28 se muestran los perfiles electroforéticos de las cuatro especies graníferas del género y algunos de sus cultivares. En el esquema de la figura 32 se señalan las bandas marcadoras para cada una de las especies. El esquema está basado en dichas corridas, en otras previas y en las observaciones realizadas en la corrida comparativa que se muestra en la figuras 30 y 31. Al comparar las cuatro especies se consideró un total de 50 bandas.

Al analizar la figura 32 puede verse que *A. mantegazzianus* es la especie que presenta mayor número de bandas (34), poseyendo 8 bandas propias (9, 10, 14, 23, 28, 29, 35, 36). Los cultivares estudiados no presentan diferencias entre sí. *A. caudatus* posee un total de 30 bandas, con 2 bandas propias (22 y 30). Los cultivares de esta especie presentan algunas diferencias, siendo la banda 22 propia de los cultivares 120 y G10 y la 30 de los cultivares "Love lies bleeding" (Llb) y G22. *A. caudatus* y *A. mantegazzianus* comparten un número importante de bandas (16,18, 19, 39, 41, 43 y 49). *A. hypochondriacus* posee

27 bandas, siendo propias las 21, 25, 26, 27, 28. Las bandas 26 y 27 las comparten los cultivares 309 y G6, mientras que las bandas 25 y 34 son propias del cultivar Artasa. Es interesante señalar que la banda 5, presente en todas las especies graníferas, se encuentra ausente en los cultivares estudiados de *A. hypochondriacus*. *A. cruentus* posee 27 bandas, de las cuales 5 son propias (13, 20, 24, 31 y 32). Los cultivares estudiados no se diferencian en los perfiles proteicos. *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* comparten las bandas 17 y 33..

La especie silvestre *A. spinosus* presentó un total de 31 bandas, siendo propias las 51* 52* 53* 54* 55* 56* 57* 58* y 59*(Fig. 29). La banda 8 presente en todas las especies graníferas, se encuentra ausente en *A. spinosus*. Se observaron diferencias en los perfiles electroforéticos entre las distintas procedencias del material analizado (Fig. 29).

4.2. Análisis numérico

A partir de los datos obtenidos de los patrones electroforéticos se contruyó la matriz básica de datos que se muestra en la tabla 10. En las filas se representan las bandas y en las columnas las OTU.

4.2.1. Coeficientes de Similitud

A partir de la matriz básica de datos se analizaron los mismos utilizando los dos coeficientes que permite la existencia de datos doble estado: Mean Character Difference (MCD) y el coeficiente de asociación de Jaccard.

4.2.1.2. Análisis de Agrupamientos

Para ambos coeficientes se utilizaron los tres análisis de agrupamientos más comunmente usados: Ligamiento Simple, Ligamiento Completo y Ligamiento Promedio (UPGMA). Como resultado se obtuvo una matriz de si-

militud. En la tabla 11 se muestra la matriz de similitud obtenida utilizando al análisis de agrupamiento UPGMA

4.2.1.3. Construcción de los Fenogramas

A partir de las matrices de agrupamientos se construyó el fenograma que se muestran en la figura 33. Dado que todos en los análisis de agrupamientos realizados resultados fueron semejantes, se muestra un sólo fenograma de similitud y utilizando el análisis de agrupamientos UPGMA.

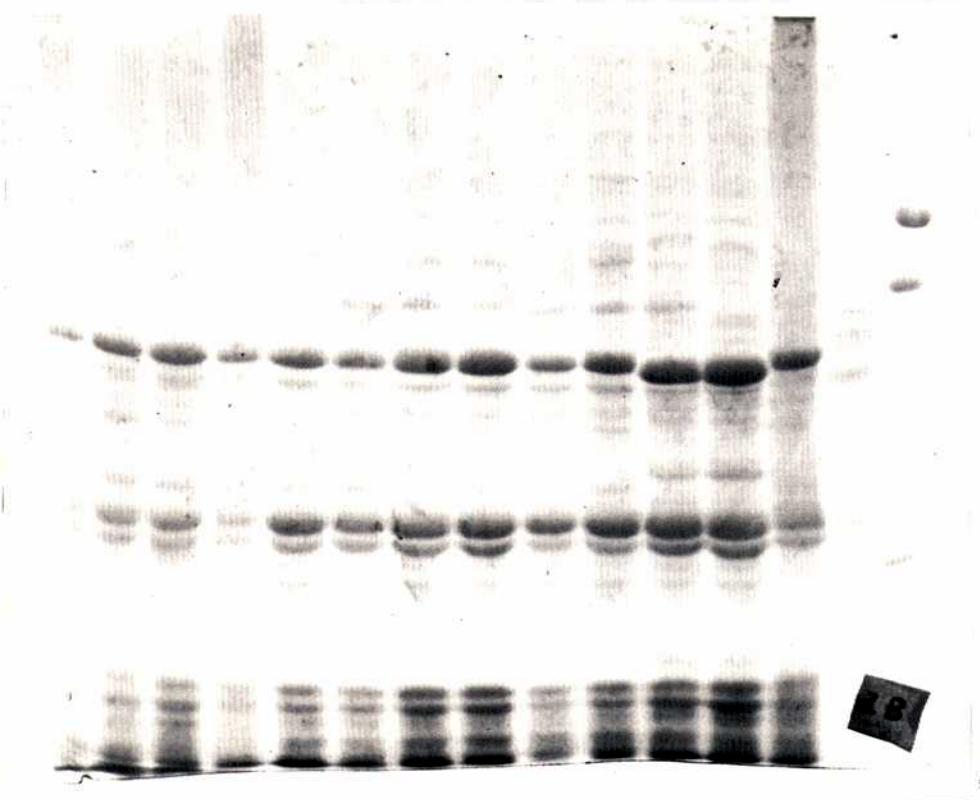
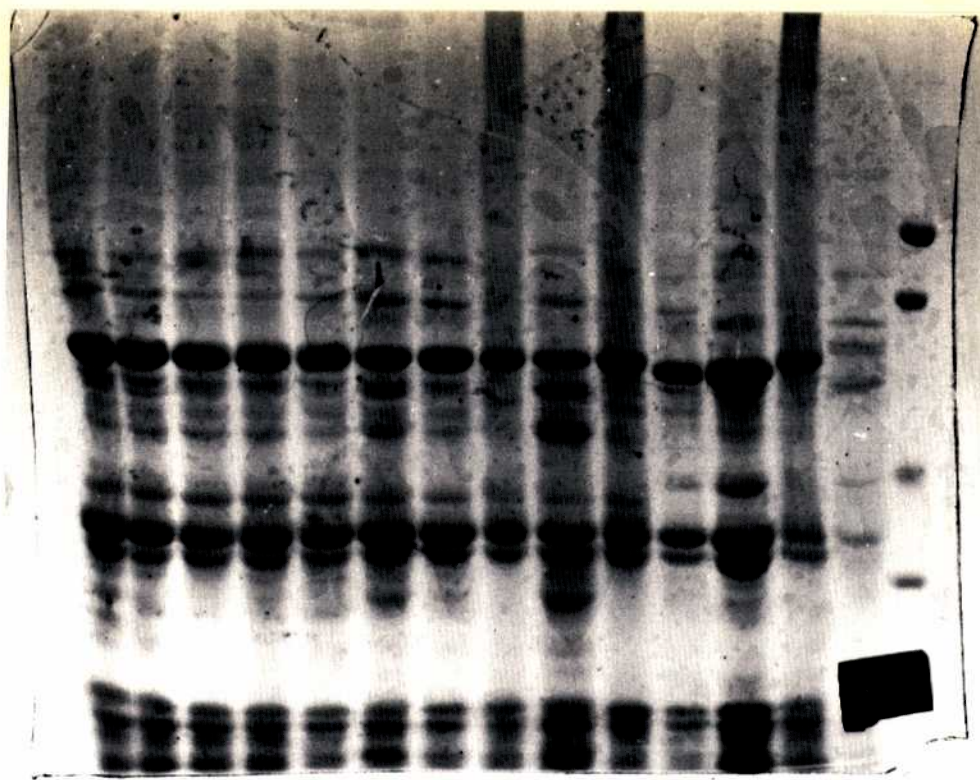


Figura 25:A= Calle 1-10 *A. mantegazzianus* cv Don Juan; 11 *A. hypochondriacus* IFSC; 12 *A. cruentus* IFSC; 13 *A. mantegazzianus* cv Don Manuel; 14 Trigo; 15 MPM.

B= Calle 1-10 *A. mantegazzianus* cv Don Manuel; 11 *A. hypochondriacus* IFSC, 12 *A. cruentus* IFSC; 13 *A. mantegazzianus* cv Don Juan; 14 Trigo, 15 MPM.

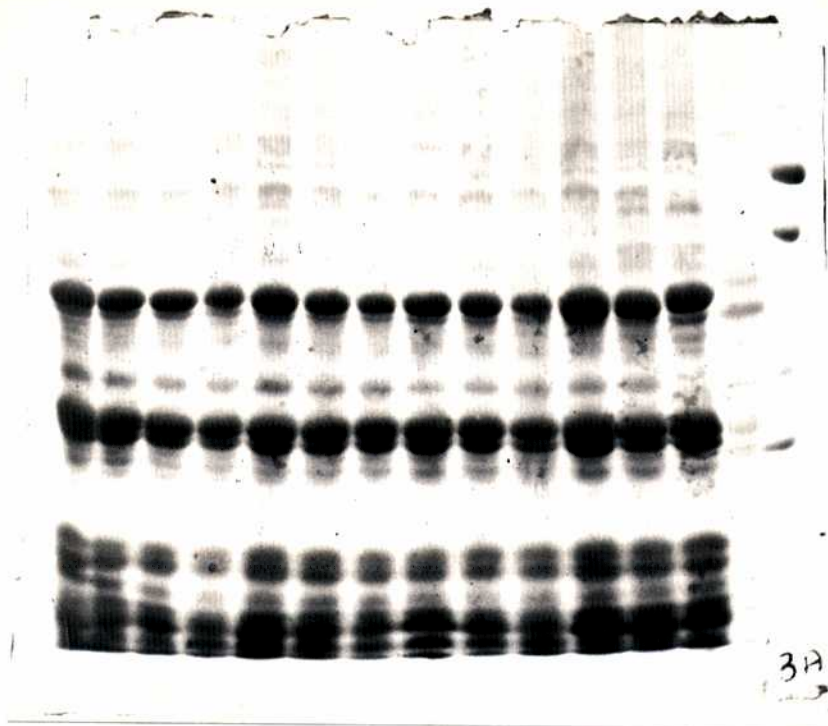
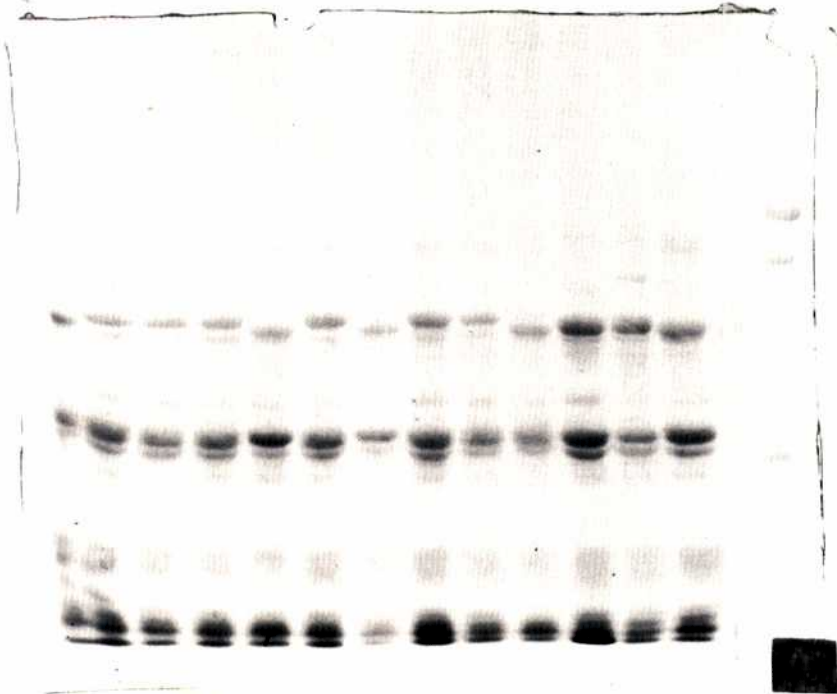
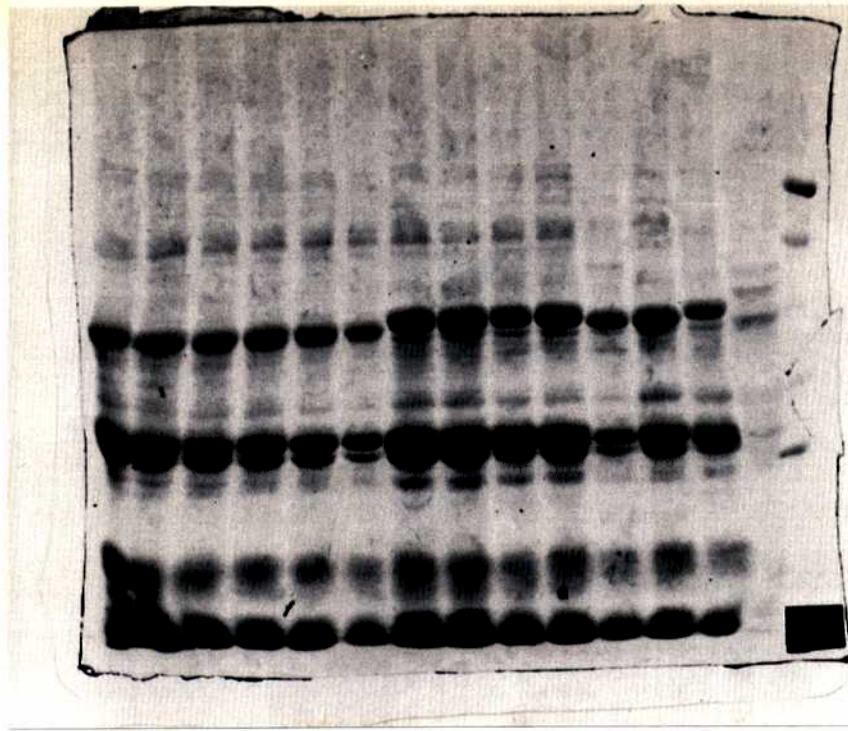


Figura 26:A= Calle 1-5 *A. cruentus* cv Don Armando; 6-10 *A. cruentus* cv Don Giem; 11 *A. cruentus* Morelos, México; 12 *A. hypochondriacus* IFSC, 13 *A. mantegazzianus* cv Don Manuel; 14 Trigo; 15 MPM.

B= Calle 1-10 *A. cruentus* Morelos, México; 11 *A. cruentus* cv Don Giem; 12 *A. mantegazzianus* cv Don Manuel; 13 *A. hypochondriacus* IFSC; 14 Trigo; 15 MPM.



Figural 27: A= Calle 1-5 *A. caudatus* cv Linea 120; 6-10 *A. caudatus* cv Love Lies Bleeding; 11 *A. hypochondriacus* IFSC; 12 *A. cruentus* IFSC; 13 *A. caudatus* G22; 14 Trigo; 15 MPM.

B= Calle 1-10 *A. caudatus* G10, G19; G25, G22, G11, G12, G13, G20, G21, G22; 11 *A. cruentus* IFSC, 12 *A. hypochondriacus* IFSC, 13 *A. caudatus* cv Linea 120; 14 Trigo; 15 MPM.

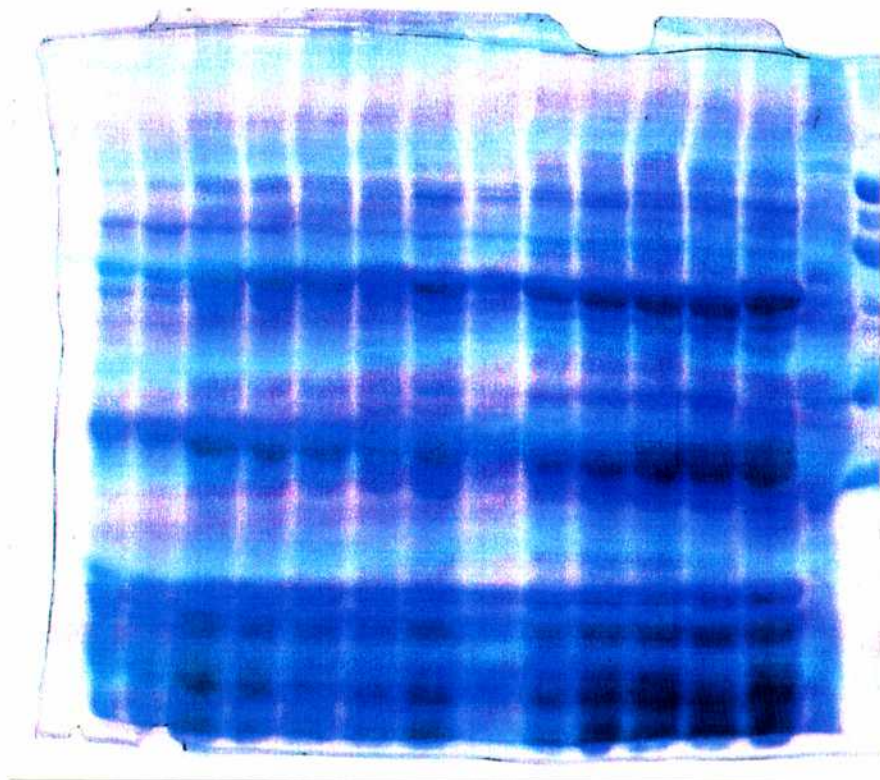
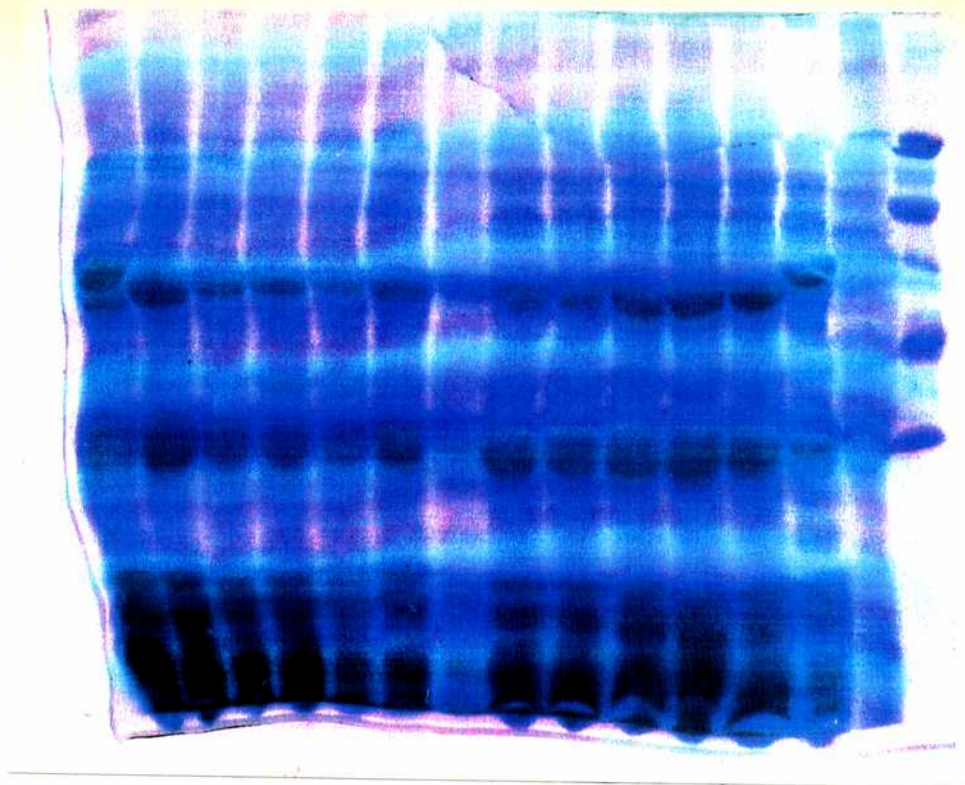


Figura 28: A= Calle 1-2 *A. hypochondriacus* iFSC; 3-7 *A. hypochondriacus* G4, G8, G7, G5, G6; 8-12 *A. hypochondriacus* cv Artasa; 13 *A. hypochondriacus* cv 309.; 14 Trigo; 15 MPM

B= Calle 1-10 *A. hypochondriacus* cv 309; 11 *A. hypochondriacus* IFSC; 12 *A. cruentus* IFSC; 13 *A. mantegazzianus* cv Don Manuel; 14 Trigo; 15 MPM.

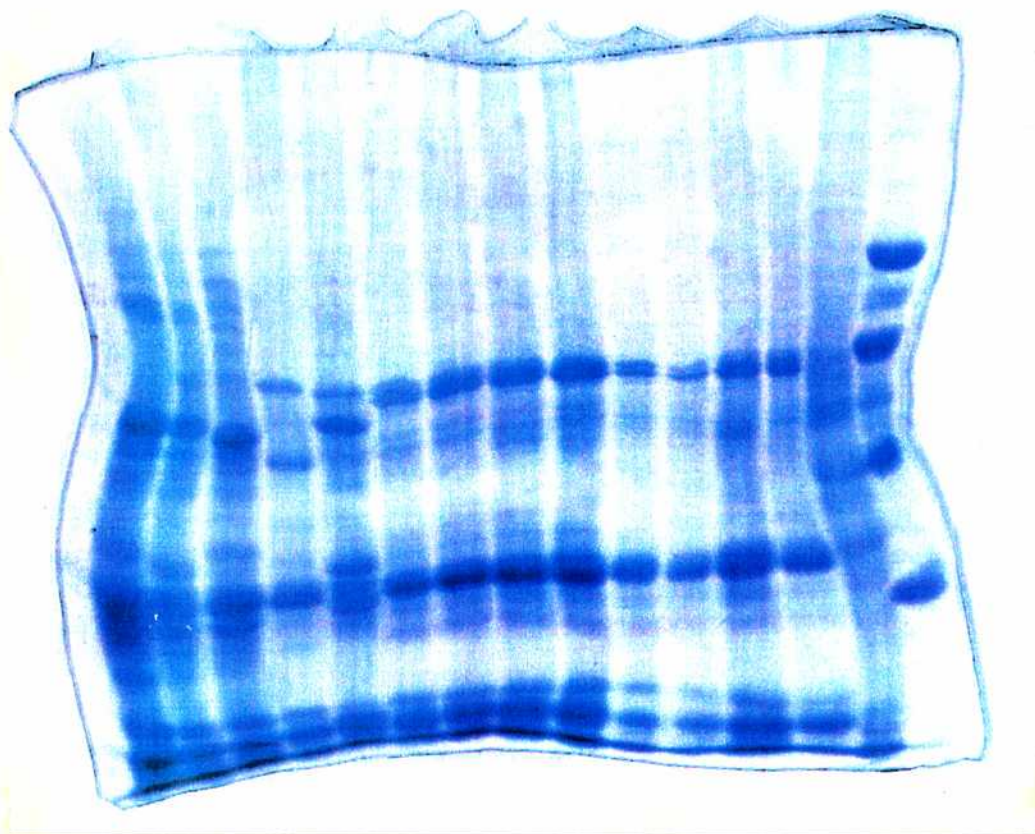


Figura 29 *A. spinosus*: Calle 1 *A. caudatus* LlB; 2 *A. mantegazzianus* cv Don Manuel; 3 *A. cruentus* cv Don Armando; 4-5 *A. spinosus* G3 y G1; 6-13 *A. spinosus* IFSC; 14 Trigo; 15 MPM.

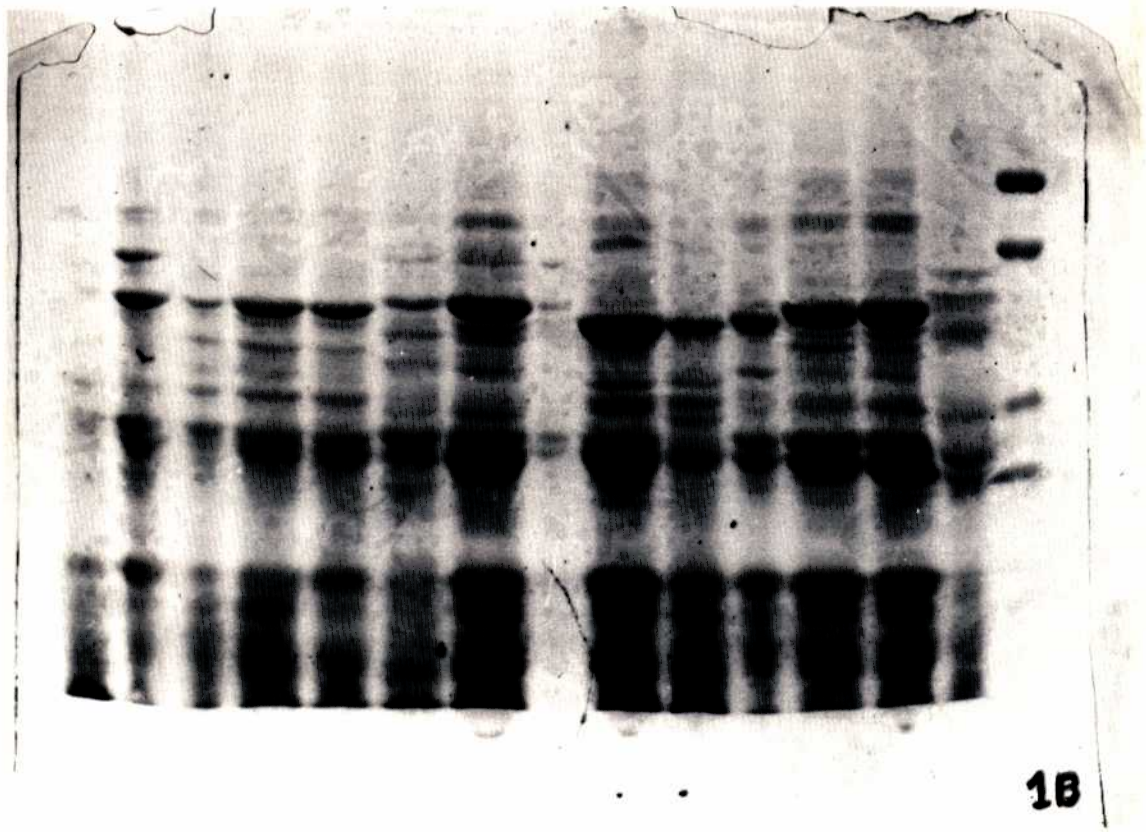


Figura 30: Corrida comparativa de las especies graníferas

Calle 1 *A. caudatus* IFSC; 2 *A. hypochondriacus* IFSC; 3-5 *A. cruentus* cv Don Armando; 6 *A. mantegazzianus* cv Don Juan; 7-8- *A. mantegazzianus* cv Don Manuel; 9-10 *A. hypochondriacus* cv Artasa; 11 *A. caudatus* Linea 120; 12-13 *A. caudatus* cv Lib; 14 Trigo; 15 MPM

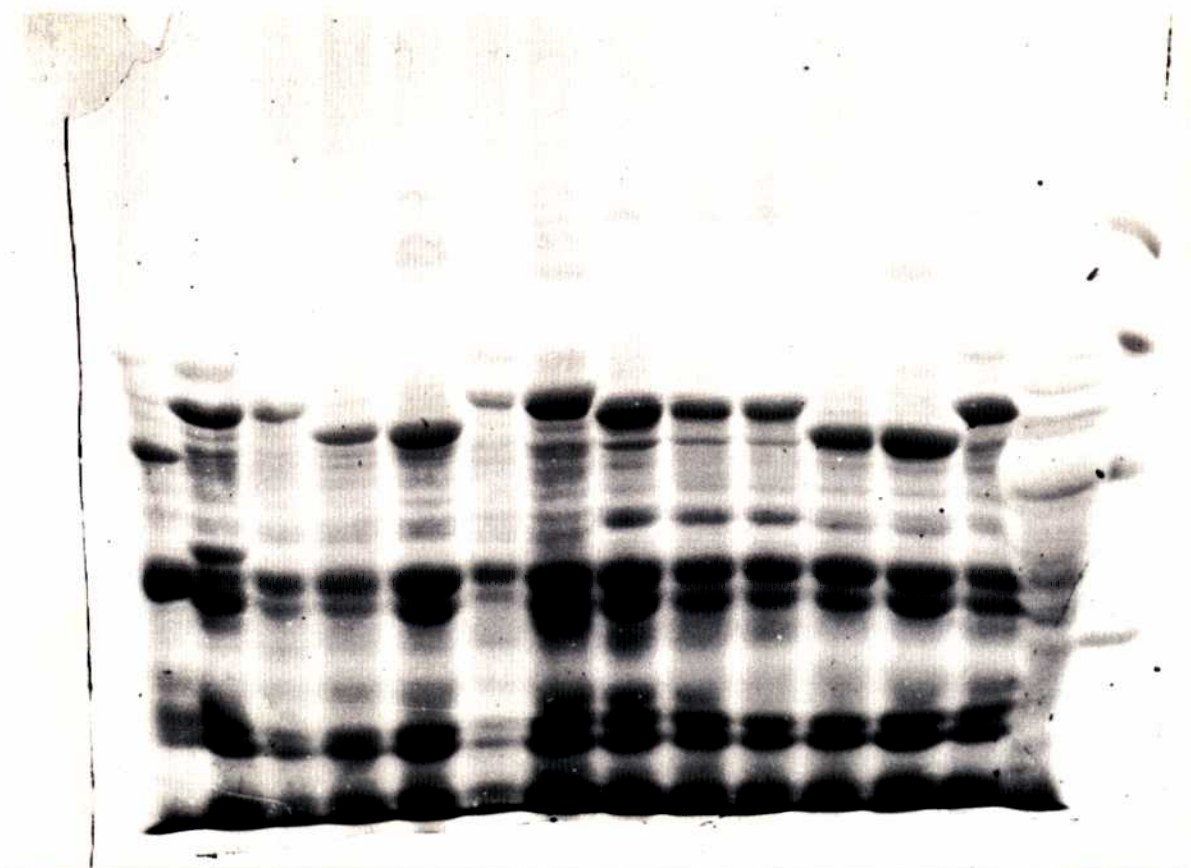


Figura 31: Corrida comparativa de todas las especies estudiadas
Calle 1-2 *A. spinosus*; 3-5 *A. caudatus*; 6-7 *A. mantegazzianus*; 8-10 *A. cruentus*;
11-13 *A. hypochondriacus*; 14 Trigo; 15 MPM

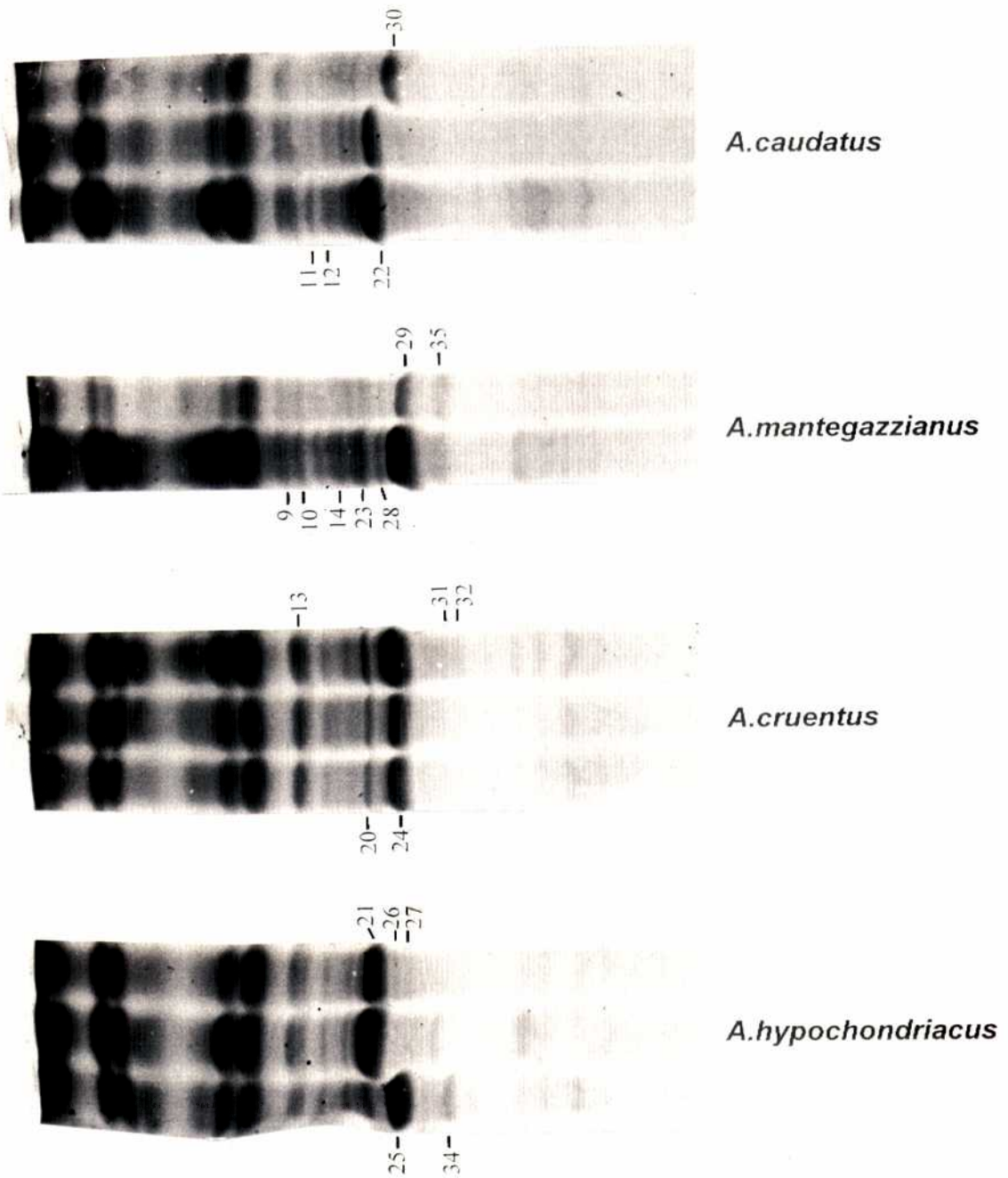


Figura 32. Perfiles electroforéticos de las cuatro especies graníferas. Se señalan las bandas marcadoras para cada especie

	hyAr	hy309	hyG6	crIFSC	crDG	crDA	crMex	maDM	maDJ	maRIV	ca120	caG10	caG22	caLLB	spG8	spG3	spIFSC
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
5	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
11	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
17	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
20	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
31	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
39	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
41	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
42	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
43	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
44	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
45	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
46	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
47	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
49	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1

Tabla 11. Matriz de similitud utilizando el método de agrupamiento UPGMA

	hypoAr	hypo309	hypoG6	cruFSC	cruDG	cruDA	cruMex	mantDI	mantDJ	mantRiV	cauL120	cauG10	cauG22	cauLove	spinG6	spinG3	spinIFSC
hypoAr	1.000																
hypo309	0.808	1.000															
hypoG6	0.846	0.958	1.000														
cruFSC	0.667	0.633	0.667	1.000													
cruDG	0.667	0.633	0.667	1.000	1.000												
cruDA	0.667	0.633	0.667	1.000	1.000	1.000											
cruMex	0.667	0.633	0.667	1.000	1.000	1.000	1.000										
mantDM	0.425	0.436	0.425	0.439	0.439	0.439	0.439	1.000									
mantDJ	0.425	0.436	0.425	0.439	0.439	0.439	0.439	1.000	1.000								
mantRiV	0.425	0.436	0.425	0.439	0.439	0.439	0.439	1.000	1.000	1.000							
cauL120	0.545	0.563	0.545	0.514	0.514	0.514	0.514	0.714	0.714	0.714	1.000						
cauG10	0.545	0.563	0.545	0.514	0.514	0.514	0.514	0.714	0.714	0.714	1.000	1.000					
cauG22	0.594	0.613	0.594	0.559	0.559	0.559	0.559	0.667	0.667	0.667	0.862	0.862	1.000				
cauLove	0.594	0.613	0.594	0.559	0.559	0.559	0.559	0.667	0.667	0.667	0.862	0.862	1.000	1.000			
spinG6	0.531	0.548	0.531	0.500	0.500	0.500	0.500	0.415	0.415	0.415	0.529	0.529	0.576	0.576	1.000		
spinG3	0.485	0.500	0.485	0.457	0.457	0.457	0.457	0.381	0.381	0.381	0.486	0.486	0.486	0.486	0.786	1.000	
spinIFSC	0.500	0.516	0.500	0.471	0.471	0.471	0.471	0.390	0.390	0.390	0.500	0.500	0.500	0.885	0.815	1.000	

Tabla 10. Matriz Básica de Datos (1=presencia; 0=ausencia)
 hy=A.hypochondriacus; sp=A.spinossus; ca=A. caudatus; ma= A.
 mantegazzianus; cr=A.cruentus

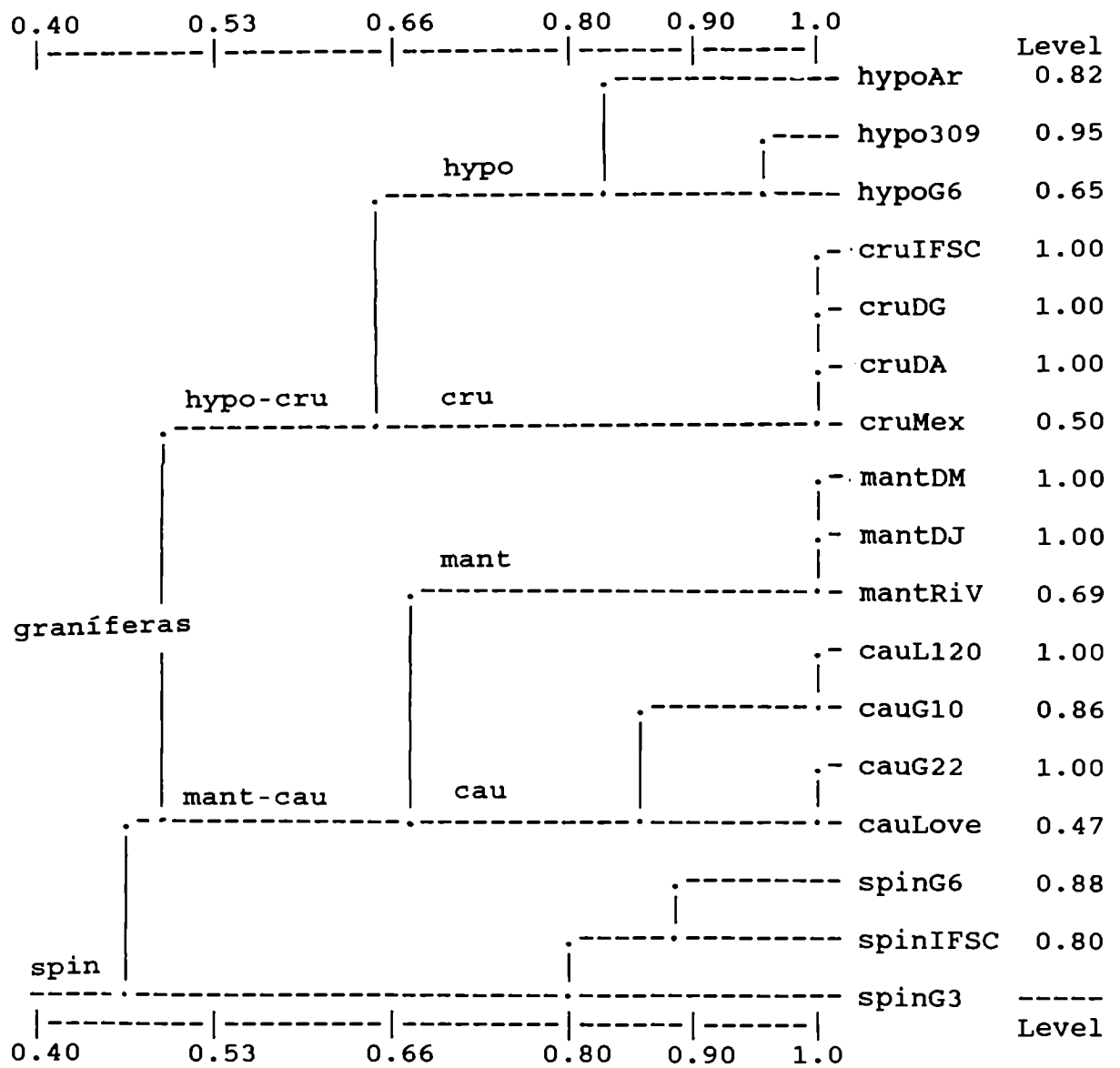


Figura 33. Fenograma de similitud, utilizando el método de agrupamiento UPGMA

5. DISCUSION

En el presente trabajo se realizaron electroforesis de proteínas seminales de distintas especies y cultivares del género. Luego se realizó un análisis numérico de los perfiles electroforéticos.

El fenograma de la figura 33 muestra que se se forman dos grupos a un nivel de similitud de 0,47. Estos grupos están formados por *A. spinosus* y por las especies graníferas. Dentro de *A. spinosus* se distinguen las distintas procedencias.

Dentro del grupo de las especies graníferas se forman dos grupos a un nivel de similitud de 0,5. El formado por *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* y el formado por *A. mantegazzianus* y *A. caudatus*.

A. hypochondriacus se diferencia de *A. cruentus* a un nivel de similitud de 0,65 y *A. mantegazzianus* de *A. caudatus* a un nivel de 0,69.

Dentro de *A. cruentus* y los de *A. mantegazzianus* los cultivares no pueden distinguirse. Esta homología entre cultivares podría deberse a que poseen un origen común. En cambio en *A. hypochondriacus* los tres cultivares pueden ser discriminados, siendo el cultivar Artasa el más diferenciado.

En *A. caudatus* los cultivares se asocian en dos grupos, siendo más afines los cultivares 120 y G10 por un lado y G22 y Love lies bleeding por el otro.

Coons (1981) en un estudio taxonómico de relaciones interespecíficas señala que el análisis morfológico no apoya la separación de *A. mantegazzianus* como una especie distinta de *A. caudatus*. Por otro lado, Hunziker (1991)

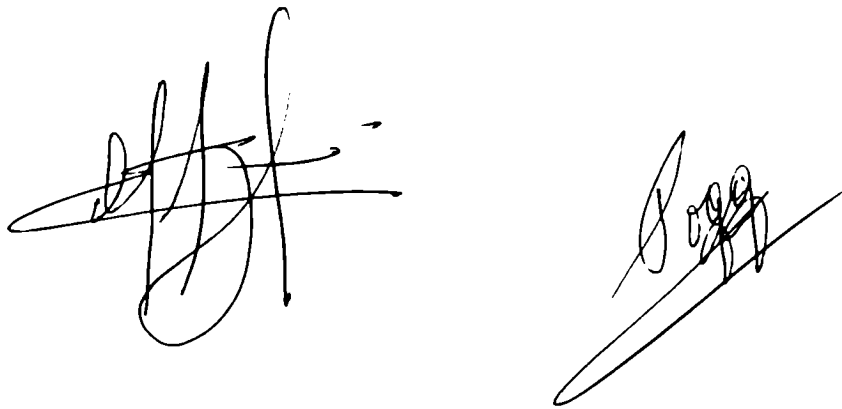
señala que ambas especies se diferencian en el color del tallo, en la morfología de las hojas y pecíolos, en la morfología, color y forma de crecimiento de las inflorescencias y en la morfología floral y que *A. mantegazzianus* habría derivado de *A. caudatus* en la región andina de Sudamérica. Los estudios citogenéticos realizados en el presente trabajo señalan que ambas especies no serían coespecíficas ya que el análisis citogenético de los híbridos indica un aislamiento post-cigótico significativo entre ambas especies. Los resultados electroforéticos concuerdan con los los citogenéticos del presente trabajo ya que si bien ambas especies están relacionadas conforman agrupamientos diferentes. Esto está de acuerdo con los resultados morfológicos obtenidos por Hunziker (1991).

Sauer (1967) propuso que *A. cruentus* habría originado a *A. hypochondriacus* por cruzamientos reiterados con *A. powellii* en centroamérica. La formación de un grupo electroforético a un nivel de similitud de 0,69 constituido por *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* estaría en concordancia con la hipótesis mencionada.

Además del análisis de las especies graníferas se estudiaron varios orígenes de *A. spinosus*. Esta especie se diferencia morfológicamente de las demás especies del género por poseer espinas, y por la disposición de las flores femeninas y masculinas en la inflorescencia. Además, el comportamiento meiótico del híbrido *A. spinosus* x *A. hybridus* sugirió que posee una constitución genómica diferente.

Los estudios electroforéticos realizados concuerdan con las relaciones mencionadas ya que *A. spinosus* forma un agrupamiento separado al formado por las especies graníferas (fig. 33).

Los datos obtenidos hasta el momento en *Amaranthus* señalan que, siendo la electroforesis una técnica rápida y relativamente económica será de gran utilidad como complemento para la identificación de cultivares y especies, analizar la diversidad genética y aclarar problemas taxonómicos y evolutivos.



IV. BIBLIOGRAFIA

- Alexander, M. P., 1967. Differential staining of aborted and non-aborted pollen. *Stain Tech.* 2(3): 117-137.
- Amos, A. y G. Dover, 1981. The distribution of repetitive DNAs between regular and supernumerary chromosomes in species of *Glossina* (Tse-tse): a two steps process. In *The origin of supernumeraries. Chromosoma* 81: 673-690.
- Auquier, P. & R. Renard, 1975. Nombres chromosomiques des quelques angiospermes du Kwanda, Burundi et Kivu (Zaire). I. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* 45: 421-445.
- Avisé, J.C., 1975. Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.* 23: 465-481.
- Bachmann, K., K.L. Chambers y H.J. Price, 1979. Genome size and phenotypic evolution in *Microseris* (Asteraceae, Cichoriaceae). *Plant Syst. Evol.* 2: 41-66.
- Bachmann, K., K.L. Chambers y H.J. Price, 1985. Genome size and natural selection: observations and experiments in plants. In *The evolution of Genome Size*. Cavalier-Smith, T. (ed.) John Wiley & Sons New York.
- Baetcke, K.P., A.H. Sparrow, C.H. Nauman y S.S. Schwemmer, 1967. The relationships of DNA content to nuclear and chromosome volumes and to radiosensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 58: 553-540.

- Baquar, S.R. & O.O.Olusi, 1988. Cytomorphological and phylogenetic studies of the genus *Amaranthus* from Nigeria. *Kromosomo* 11 51-52: 1665-1674.
- Bauer, H., 1932. Die Feulgensche Nuklearfärbung in ihre Anwendung auf cytologische Untersuchungen. *Z. Zellforsch* 15: 225.
- Becker, R., E.L. Wheeler, K. Lorenz, A.E. Stafford, O.K. Grosjean, A.A. Betschart & R.M. Saunders, 1981. A compositional study of amaranth grain. *J. Food. Sci.* 46: 1175-1180
- Behera, B. & Paitnaik, S. N. 1974. Cytotaxonomic studies in the family Amaranthaceae. *Cytologia* 39: 121-131.
- Behera, B. & Paitnaik, S. N. 1977. Genome analysis of *Amaranthus dubius* Mart. ex Thell. through the study of *A. spinosus* x *A. dubius* hybrids. *Proc. Indian Sci. Congr. Assoc.* 64: 144.
- Behera, B. & Paitnaik, S. N., 1982. Genome analysis of *Amaranthus dubius* Mart. ex. Thell. through the study of *A. spinosus* x *A. dubius* hybrids. *Cytologia* 47: 379-389.
- Bennett, M.D., 1971. The duration of meiosis. *Proc. Royal Soc. Lond. Ser. B.* 178: 277-299.
- Bennett, M.D., 1972. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proc. Royal Soc. Lond. Ser.B* 181: 109-135.
- Bennett, M.D. 1985. Intraspecific variation in DNA amount and the nucleotypic dimension in plant genetics. In *Plant Genetics* Freeling, M. (ed.) . Alan R. Liss, Inc. New York.
- Bennett, M.D., 1987. Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New Phytol.* 106: 177-200

- Bennett, M.D. & J.B. Smith, 1976. Nuclear DNA content in angiosperms. Proc. R. Soc. London Ser. B 274: 227-274.
- Bertoni, M.H. & P. Cattaneo, 1987. Aspectos nutricionales del follaje y de la semilla de amarantos americanos cultivados. Actas de las Primeras Jornadas Nacionales sobre Amarantos. (Santa Rosa, La Pampa): 63-86
- Bir, S.S. & M. Sidhu, 1975. Weed flora of cultivable lands in Punjab maize fields in Patriala district. Acta Bot. Indica 3: 136-141.
- Bir, S.S. & M. Sidhu, 1979. Cytological observations in weed flora of orchards of Patriala district, Punjab. Recent. Res. Pl. Sci. (New Delhi) 7: 261-271.
- Bir, S.S. & M. Sidhu, 1980. Cyto-palynological studies on weed flora of cultivable lands of Patriala district (Punjab). J. Palynology 16: 85-105.
- Bloch, D.P. & G.C. Goldman, 1955a. A microphotometric study of the synthesis of deoxyribonucleic acid and nuclear histone. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1: 17-28.
- Bloch, D.P. & G.C. Goldman, 1955b. Evidence of differences in the deoxyribonucleoprotein complex of rapidly proliferating and non-dividing cells. J. Biophys Biochem Cytol. 1: 531-550.
- Böhm, N., 1968. Einfluss der Fixierung und der Säurekonzentration auf die Feulgen hydrolyse bei 28°C. Histochemie 14: 201.
- Böhm, N., E. Sprenger, G. Schüter und W. Sandritter, 1968. Proportionalitätsfehler bei der Feulgen-Hydrolyse. Histochemie 16: 100-118.
- Britten, R.J. & D.E. Kohne, 1968. Repetead sequences in DNA. Science 161: 529-540.

- Brody, T. 1974. Histones in cytological preparations. *Exp. Cell. Res.* 85: 255-263.
- Burghardt, A.D. & L. Poggio, 1990. Variación de esterases en dos especies de amarantos (*Amaranthus cruentus* L. y *A. mantegazzianus* Passer.). *Amarantos. Novedades e Informaciones* 4: 2-3.
- Burghardt, A.D. & R.A. Palacios, 1984. Variabilidad electroforética en cuatro especies de *Prosopis* (Leguminosae). XV Congr. Arg. Genét. Resúmenes: 65.
- Cain, A.J. & G.A. Harrison 1958. An analysis of the taxonomist's Judgement of Affinity. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 131: 85.
- Caldwell, K.A. & D.D. Kasarda, 1978. Assessment of genomic and species relationships in *Triticum* and *Aegilops* by PAGE differential staining of albumins and globulins. *Theor. Appl. Genet.* 52: 273-280.
- Carpenter Standley, P. 1917. In North American Flora. Vol. 21 (2). Publicado por The New York Botanical Garden.
- Carr, G.D., 1987. Additional chromosome numbers of Hawaiian flowering plants. *Pacific Sci.* 39: 302-304.
- Carretero, J.L., 1984. Chromosome number reports LXXXIV. *Taxon* 33: 536-539.
- Cavalier-Smith, T., 1978. Nuclear volumen control by nucleo-skeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *J. Cell Sci.* 34: 247-278.

- Cave, M.S. (Ed.). 1958-1964. Index to plant chromosome numbers. Vol 1(1-4), Vol 2(5-9). Calif. Bot. Soc. Berkeley; Univ. North Carolina Press Chapel Hill, N.C.
- Comas, C.I., 1993. Estudios electroforéticos de enzimas y proteínas seminales en el género *Bulnesia* (Zigophyllaceae). Tesis Doctoral, FCEN, UBA.
- Comas, C.I. , J.H. Hunziker & J.V. Crisci, 1979. Species relationships in *Bulnesia* as shown by seed protein electrophoresis. Biochem. System. Ecol. 7: 303-308.
- Comas, C.i., J.H. Hunziker & A.D. Burhardt, 1984. Estudios electroforéticos de proteínas seminales en *Bulnesia retama*, *B. chilensis* y su relación con otras especies del género. Darwiniana 25: 227-234.
- Conn, H.J., 1953. Biological constrains. Biotechn. Publ. Geneva, New York.
- Coons, M. P. 1977. *Status of Amaranthus hybridus* L. in South America. Ciencia y Naturaleza 18(1): 80-87.
- Coons, M.P. 1981. O genero *Amaranthus* em Minas Geraes. Experientae 27(6): 115-158.
- Coons, M.P., 1982. Relationships of *Amaranthus caudatus*. Econ. Bot. 36: 129-146.
- Covas, G., 1984. Las especies de *Amaranthus* L. Amaranthaceae, nativas o naturalizadas en la Provincia de La Pampa. Apuntes para la flora de La Pampa. Mayo 1984. pp: 333-341.
- Covas, G., 1991. Dos híbridos espontáneos interseccionales del género *Amaranthus* L. Actas Primer Congreso Internacional del Amaranto (Morelos, México): 23.

- Covas, G. & J.H. Hunziker, 1954. Estudios cariológicos en antófitas. IV Parte. Rev. Inv. Arg. (Buenos Aires) 8: 249-253.
- Crawford, D.J., 1974. Variation in the seed proteins of *Chenopodium incarnum*. Bull. Torrey Bot. Club. 101: 72-77.
- Crawford, D.J., 1989. Enzyme electrophoresis and plant systematics. In Isozymes in plant biology. D.E. Soltis and P.S. Soltis (de). Cap. 7: 146-164.
- Crawford, D.J. & E.A. Julián, 1976. Flavonoid chemistry of *Chenopodium fremontii* infraspecific variation and systematic implications at the interspecific level. Biochem. Syst. Ecol. 6: 189-192.
- Crisci, J.V. y M.F. López Armengol, 1983. Introducción a la teoría y práctica de la Taxonomía Numérica. Serie Biología. Monografía N° 26. O.E.A.
- Cherry, J.P., F.R.H. Katterman & J.E. Endrizzi, 1970. Comparative studies of seed proteins of species of *Gossypium* by gel electrophoresis. Evolution 24: 431-447.
- Cherry J.P., F.R.H. Katterman & J.E. Endrizzi, 1971. A comparative study of seed proteins of allopolyploids of *Gossypium* by gel electrophoresis. Can. J. Genet. Cytol. 13: 155-158.
- Chooi, W.Y., 1971. Variation in nuclear DNA content in the genus *Vicia*. Genetics 68: 195-211.
- Dalgaard, V., 1986. Chromosome studies in flowering plants from Macaronesia. Ann Jard. Bot. Madrid 43: 83-111.
- Dalgaard, V., 1986a. Chromosome numbers in flowering plants from Madeira. Willdenowia 16: 221-240.
- Darlington, C.D., 1928. Studies in *Prunus*. J. Genet. 19: 213-256

- Darlington, C.D., 1956. Chromosome botany. Allen and Unwin. Londres
- Datta , A.K., J.L. Das & A.K. Biswas, 1987. Electrophoretic characterization and evaluation of proteins in control and mutant lines of *Nigella sativa*. *Cytologia* 52: 317-322.
- Davis, B.J., 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121: 404-427.
- De Cosse, J.J & N. Aiello, 1966. Feulgen hydrolysis: effect of acid and temperature. *J. Histochem. Cytochem.* 14: 601-604.
- Deitch, A.R., 1966. Cytophotometry of nucleic acids. In *Introduction to Quantitative Cytochemistry*. G. Wild (ed.) Acad. Press. New York. pp. 327
- de la Rosa, L. & N. Jouvé, 1992. Genetic variation for isozyme genes and proteins in Spanish primitive cultivars and wild subspecies of *Lens*. *Euphytica* 59: 181-187.
- Desai, S. R., 1971. Morphological and cytological studies on Amarantheaceae. *Cytologia* 36: 349-353.
- Desborough, S. & S.J. Peloquin, 1966. Disc electrophoresis of tuber proteins from *Solanum* species and interspecific hybrids. *Phytochem.* 5(4): 727-733.
- Diers, L., 1961. Der Anteil an Polyploiden in der vegetations UrteIn der Westkordillere Perus *Zeits. Bot.* 49: 437-438.
- Dmitrieva, S.A., 1986. Chromosome numbers in some species of vascular plants of Byelorussia. *Bot. Zurn.* 71: 1145-1147
- Di Stephano H.S., 1948 A cytochemical study of the Feulgen nuclear reaction. *Chromosoma* 3: 282.

- Doolittle, W.F. y C. Sapienza, 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284: 601-603.
- Duijordam, W.A.L. & P. Van Duijn, 1975. The influence of chromatin compactness on the stoichiometry of the Feulgen-Schiff Procedure studied in model films. I. Theoretical kinetics and experiments with films containing isolated deoxyribonucleic acid. *J. Histochem. Cytochem.* 23: 882
- Edmonds, J.M. & S.M. Glidewell, 1977. Acrylamide gel electrophoresis of seed proteins from some *Solanum* (Section *Solanum*) species. *Plant Syst. Evol.* 127: 277-291.
- Evans, G.M. y H. Rees, 1971. Mitotic cycle in dicotyledons and monocotyledons. *Nature* 233: 350-351.
- Feulgen, R. y H. Rössembeck, 1924. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende selektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Hoppe Seylers Z. physiol. Chem.* 135: 303-348.
- Flavell, R.B., 1986. Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 312: 327-342.
- Flavell, R.B., M.D. Bennett, J.B. Smith y D.B. Smith, 1974. Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochem. Genet.* 12: 257-269.
- Fox, 1969. Some characteristics of the cold hydrolisis technique for staining plant tissues by the Feulgen reaction. *J. Histochem. Cytochem.* 17: 266-272.
- Frey, L., 1971. Chromosomes numbers of several species of flowering plants in Poland. *Folia Florist. Geobot.* 17: 251-256.

- Fritsch, R.M., 1973. In IOPB chromosome number reports XLI. *Taxon* 22: 459-464.
- Gill, B.S. & S. Vasudeva, 1970. Cytological studies in some members of *Amaranthaceae*. *Curr. Sci.* 39: 445-446.
- Giráldez, R., M.C. Cermeño y J. Otrllana, 1979. Comparison of C-banding patterns with chromosomes of inbred lines and open pollinated varieties of rye. *Z. Planzenzucht* 83: 40-48.
- Goldblatt, P. (Ed.), 1981. Index to plant chromosome numbers for 1975-1978. Miss. Bot. Garden. St. Louis, USA.
- Goldblatt, P. (Ed.), 1984. Index to plant chromosome numbers for 1979-1981. Miss. Bot. Garden. St. Louis, USA.
- Goldblatt, P. (Ed.), 1985. Index to plant chromosome numbers for 1982-1983. Miss. Bot. Garden. St. Louis, USA.
- Gonzalez Aguilera, J.J., P. Arriaga Martitegui & A.M. Fernández Peralta, 1986. Differentiation in the seed proteins profiles of two closely related species of *Narcissus*. *Biochem. Syst. Ecol.* 14(6): 657-659.
- Grant, F. W., 1958. Cytological aspects of sex determination phylogenetic trends in dioecious species of *Amaranthus* (abstract) *Proc. X Int. Cong. Gen.* 2: 103.
- Grant, F. W., 1959a. Cytogenetic studies in *Amaranthus* I. Cytogenetical aspects of sex determination in dioecious species. *Can. J. Bot.* 37: 413-417.
- Grant, F.W., 1959b. Cytogenetic studies in *Amaranthus* II. Natural interspecific hybridation between *Amaranthus dubius* and *A. spinosus*. *Can. J. Bot.* 37: 1063-1070.

- Grant, F.W., 1959c. Cytogenetic studies in *Amaranthus* III. Chromosome numbers and phylogenetic aspects. *Can. J. Genet. Cytog.* 1: 313-318.
- Grant, F.G., 1987. Genome differentiation in higher plants. In *Differentiation patterns in higher plants*. K.M. Urbanska (ed.) Academic Press. Lond. pp. 9-32.
- Gray, J.R., D.E. Fairbrothers & J.A. Quinn, 1973. Biochemical and anatomical population variation in the *Danthonia sericea* complex. *Bo. Gaz.* 134: 166-173.
- Gupta, V.K. & S. Gudu, 1991. Interspecific hybrids and possible phylogenetic relations in grain amaranths. *Euphytica* 52: 33-38.
- Hall, O., 1964. Use of proteins in determination of parental species of unknown hybrids. *BioScience* 14: 37.
- Harbone, J.B. & B.L. Turner, 1984. *Plant Chemosystematics*. Acad. Press. Lond.
- Hauptli, H. & S. Jain, 1984. Allozyme variation and evolutionary relationships of grain amaranths (*Amaranthus* spp.). *Theor. Appl. Genet.* 69: 153-165.
- Heiser, C.B. 1963. Numeración cromosómica de plantas ecuatorianas. *Ciencia y Natur.* 6: 2-6.
- Hillary, B.B., 1939. Use of the Feulgen reaction in cytology. I. Effect of fixation on the reaction. *Bot. Gaz.* 101: 276.
- Hindakova, M., 1974. In *Index to chromosome number of Slovakian Flora. Part. 4*. *Acta Fac. Rerum Nat Univ. Comenianae Bot.* 23: 1-23.
- Hindakova, M., 1978. In *Index to chromosome number of Slovakian Flora. Part. 6*. *Acta Fac. Rerum Nat Univ. Comenianae Bot.* 26: 1-42.

- Hindakova, M & T. Schwarzova, 1978. In IOPB chromosome reports LXI. Taxon 27: 375-392.
- Hindakova, M & T. Schwarzova, 1980. In IOPB chromosome reports LXIX. Taxon 29: 728.
- Hsu, C., 1967. Preliminary chromosome studies on the vascular plants of Taiwan. *Taiwania* 13: 117-130.
- Huang et al, 1975. Citado por Harborne & Turner, 1984.
- Hueros, G., J.C. Sanz & N. Juvé, 1988. Chromosomal location by F₁ monosomic analysis of endosperm proteins in bread wheat. 1. One-dimensional electrophoresis of gluteins and gliadins. *Theor. Appl. Genet.* 76: 781-787.
- Hunziker, A.T., 1943. Las especies alimenticias de *Amaranthus* y *Chenopodium* cultivadas por los indios de América. *Rev. Arg. Agr.* 10(4): 297-354.
- Hunziker, A.T., 1951. Cuatro nuevas especies sudamericanas de *Amaranthus*. *Bol. Soc. Arg. Bot.* 4(1-2): 133-143.
- Hunziker, A.T., 1965. Estudios sobre *amaranthus* V. Revisión de las especies americanas con 1 a 4 estambres, 1 a 5 tépalos, e inflorescencias exclusivamente axilares. *Kurtziana* 2: 27-52.
- Hunziker, A.T. 1966. Estudios sobre *amaranthus* VI. Notas taxonómicas sobre especies sudamericanas. *Kurtziana* 3: 201-214.
- Hunziker, A.T., 1991. Sinopsis de las especies silvestres de *Amaranthus* del continente americano, con especial referencia a las monoicas. *Actas Primer Congreso Internacional del Amaranto (Morelos, México): 22*

- Hunziker, A.T. & A.M. Planchuelo, 1971. Sobre un nuevo hallazgo de *Amaranthus caudatus* en tumbas indígenas de Argentina. *Kutziana* 6: 63-67.
- Hunziker, J.H., 1967. Analysis of phylogenetic affinities and differentiation in South american *Agropyron* by cytogenetics and protein electrophoresis. *Ciencia y Cultura* 9 (1): 199-217.
- Hunziker, J.H., 1971. El uso simultáneo de datos citogenéticos y moleculares en taxonomía experimental. *Recientes adelantos en Biología*: 129-137.
- Hürgin, G., 1987. Einige Bemerkungen zu wenig bekannten *Amaranthus* Sippen (AMARANTHACEAE). *Mitteleuropas. Willdenovia* 16: 453-478.
- Jackson, R.C., 1982. Polyploidy and diploidy: New perspectives on chromosome pairing and its evolutionary implications. *Amer. J. Bot.* 69 (9): 1512-1523.
- Jackson, R.C., 1984. Chromosome pairing in species and hybrids. In Grant, W.H. (de). *Plant Biosystematic*: 67-86.
- Jain, S.K., L. Wu & K.R. Vaidya, 1980. Levels of morphological and allozyme variation in Indian amaranths: a striking contrast. *The Jour. of Heredity* 71: 283-285.
- Jain, S.K., H. Hauptli & K.R. Valdya, 1982. Outcrossing rate in grain amaranths. *J. Hered.* 73: 71-72
- Javurkova, V., 1989. In IOPB chromosome reports LXIX. *Taxon* 29: 713-714.
- John, B., 1988. The biology of heterochromatin. In Verma, R.S (ed.) *Heterochromatin. Molecular and structural aspects*. Cambridge University Press. pp.1-147.
- John, B. y King, 1983. Population cytogenetics of *Atractomopha similis* I. C-band variation. *Chromosoma* 88: 57-68.

- Jones, K., 1978. Aspects of chromosome evolution in higher plants. in *Advances in Botanical Research* Vol. 6 (H.W. Woolhouse ed. Academic Press):119-194.
- Johnson, B. L.,1972. Seed protein profile and the origin of the hexaploid wheats. *Am. J. Bot.* 59: 952-960.
- Johnson, B.L. & Fairbrother, 1975. Citado por Harbone & Turner, 1984
- Johnson, B.L. & M.M. Thien, 1970. Assessment of evolutionary affinities in *Grossypium* by protein electrophoresis. *Am. J. Bot.* 57: 1081-1092.
- Jordanav, J., 1963. On the transition of desoxiribonucleic acid to apurinic acid and the loss of the later from tissues during Feulgen reaction hydrolysis. *Acta Histochem.* 15: 135.
- Juvé, N., A. Bernardo, J. Sanz & C. Soler, 1990. Discriminación de variedades de cebada (*Hordeum vulgare* L.) mediante electroforesis.1: Análisis de hordeinas por SDS-PAGE. *Invest. Agraria* 5: 7-23.
- Kalinowsky, L.S., 1988. Los amarantos: nueva alternativa alimentaria. *Actas de las Primeras Jornadas Nacionales sobre Amarantos* (Santa Rosa, La Pampa, Argentina): 96-100.
- Kasten, F.H., 1960. The chemistry of Schiff's reagent. *Intern. Rev. Cytol.* 10: 1-100.
- Kempanna, C. y R. Riley, 1964. Secondary association between genetically equivalent bivalents. *Heredity* 19: 289-299.
- Khoshoo, T. N. & Pal, M. 1972. Cytogenetic patterns in *Amaranthus*. *Chromosome Today* 3: 259-267.

- Kjellstrand, P.T.T., 1977. Temperature and acid concentration in the search for optimum Feulgen hydrolysis conditions. *J. Histochem. Cytochem.* 25: 129-134.
- Kiehn, M., E. Vitek, E. Hellmayr, J. Walter, J. Tschentt, C. Justin & E. Mann, 1991. Beiträge zur Flora von Österreich Chromosomenzählungen. *Verh. Zool-Bot. Ges Österreich* 128: 19-39.
- King y M.B. John, 1980. Regularities and restrictions governing C-band variation in acridoid grasshoppers. *Chromosoma* 76: 123-150.
- Kliphuis, E. & J.H. Wieffering, 1972. Chromosome numbers of some angiosperms from the South of France. *Acta. Bot. Neerl.* 21: 598-604.
- Kliphuis, E. & Y.I. Barkoudah, 1977. Chromosome numbers in some Syrian Angiosperms. *Acta Bot. Neerl.* 26: 239-249.
- Koul, A.K., A.K. Wathlu & J.L. Karihaloo, 1976. Chromosome numbers of some flowering plants of Jammu. I. *Chromosome Information Service* 20: 30-33.
- Krahulcova, A., 1990. Selected chromosome count of the Czechoslovak flora II. *Folia Geobot Phytotax.* 25: 381-388
- Krasnikov, A. & M.N. Lomonosova, 1990. Chromosome numbers in representatives of some families of vascular plants in the flora of the Novosibirsk region. *J. Bot. Zurn* 75: 116-118.
- Lacadena, J.R. y M.J. Puertas, 1969. Secondary associations of bivalents in an allohexaploid, *Aegilops triaristata* Willd. 6x. *Genet. Iber.* 21: 191-209.
- Ladizinsky, G., 1975. Seed protein electrophoresis of the wild and cultivated species of the section *Faba* of *Vicia*. *Euphytica* 24: 785-788.

- Ladizinsky, G. & A. Adler, 1975. The origin of chickpea *Cicer arietinum*. L. Euphytica 25: 211-217.
- Ladizinsky, G. & T. Hymowitz, 1979. Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. Theor. Appl. Genet. 54: 146-151.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Lanham, P.G., B.P. Forster & P. McNivol, 1994. Seed storage protein variation in *Arachis* species. Genome 37: 487-496
- Lawrence, W.J.C., 1931. The secondary association of chromosomes. Cytologia 2: 353-384.
- Levan, A., Fredga, K. & A.A. Sandberg, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52: 201-220.
- Lennart Johnson, B., 1972. Seed protein profiles and the origin of the hexaploid wheats. Amer. J. Bot. 59(9): 952-960.
- Levin, D.A. & B.A. Schaal, 1970. Reticulate evolution on *Phlox* as seen through protein electrophoresis. Am. J. Bot. 57: 977-987.
- Li, R., 1989. Studies on karyotypes of vegetables in China. Wuhan University Press, Wuhan.
- Mac Neish, R.S. 1964. Ancient Mesoamerican Civilization. Science 143: 531-537.
- Madhusoodanan, K.J. & M.A. Nazeer, 1983. Comparative morphology of the somatic karyotypes of vegetable amaranths and its phylogenetic significance. Cytologia 48: 237-244.

- Madhusoodanan, K.J. & M. Pal, 1976. A primary trisomy in *Amaranthus tricolor* L. *New Botanist*. 3: 70-73.
- Madhusoodanan, K.J. & M. Pal, 1981 Cytology of vegetable amaranths. *Bot. J. Lin Soc.* 82: 61-68.
- Madhusoodanan, K.J. & M. Pal, 1983. Colchitetraploids in '*Amaranthus tricolor* Lin. *New Botanist* 10: 17-23.
- Majovsky, J., 1970. In Index to chromosome number of Slovakian Flora. Part. 2. *Acta Fac. Rerum Nat Univ. Comenianae Bot.* 18: 45-60.
- Majovsky, J. et al., 1974. In Index to chromosome number of Slovakian Flora. Part. 4. *Acta Fac. Rerum Nat Univ. Comenianae Bot.* 23: 1-23.
- Malik, N.A. & A.J. Ahmad, 1963. Chromosome numbers in some medicinal plants. *Pakistan Journ. Sci. Res.* 15: 58-60.
- Martinez Ungria, O., 1989. Notas acerca de la quinoa y el amaranto. Cultivos indígenas en expansión. Serie I. Extensión Cultural. Ediciones RAE-Luz Verde pp.27
- Mello, M.L.S., 1976. Differential acid hydrolysis of some hetero and euchromatins. *Histochem. Cytochem.* :223-224.
- Mello, M.L.S. y Zanardi, 1976. Dados cariometricos em espermatozoides de tauro: influencia de diferentes fixadores e tempos hidrolise. *Ciencia e Cultura* 28: 551-554.
- Mello, M.L.S. y de Vidal, 1978. A reação de Feulgen. *Ciencia e Cultura* 30(6): 665-676.
- Miège, J., 1960. Troisième liste des nombres chromosomique d' especies d' Afrique occidentale. *Ann. Fac. Sci. Univ. Dakar* 5: 75-86.

- Miège, J. & N. Josserand, 1972. Nombres chromosomiques d'espèces africaines et malgaches. *Candollea* 27: 283-292.
- Mittermayer, C., H. Madreiter, B. Lederer & W. Sandritter, 1971. Differential acid hydrolysis of euchromatin and heterochromatin (biochemical, histochemical and morphological studies). *Beitr. Path.* 143: 157-171
- Molina, M.C. y C.A. Naranjo, 1987. Cytogenetic studies in the genus *Zea*. 1. Evidence for five as the basic chromosome number. *Theor. Appl. Genet.* 73: 542-550.
- Moore, R.J.(Ed), 1973. Index to plant chromosome numbers for 1967-1971. Bureau for Plant Taxonomy and Nomenclature. Utrecht, The Netherlands.
- Moore, R.J.(Ed), 1974. Index to plant chromosome numbers for 1972. Bureau for Plant Taxonomy and Nomenclature. Utrecht, The Netherlands.
- Moore, R.J.(Ed), 1977. Index to plant chromosome numbers for 1973-1974. Bureau for Plant Taxonomy and Nomenclature. Utrecht, The Netherlands.
- Mulligan, G.A., 1957. Chromosome numbers in Canadian weeds I. *Can. Jour. Bot.* 35: 779-789.
- Mulligan, G.A., 1969. In IOPB chromosome reports XX. *Taxon* 18: 213-221.
- Mulligan, G.A., 1984. Chromosome numbers of some plants native and naturalized in Canada. *Naturaliste Canad.* 111: 447-449.
- Murin, A. & I.I. Chaudhri, 1970. In IOPB chromosome reports XXVI. *Taxon* 19: 264-269.
- Murin, A. & T. Schwarzova, 1979. Karyological study of Slovakian Flora II. *Acta Fac. Rerum Nat Univ. Comeniana Bot.* 27: 135-136.

- Murray, M.J., 1940. The genetics of sex determination in the family Amaranthaceae. *Genetics* 25: 409-431
- Naranjo, C.A., 1985. Estudios citogenéticos, bioquímicos y sistemático en algunas especies americanas del género *Bromus* (Gramineae). Tesis Doctoral FCEN, UBA.
- Naranjo, C.A. y A.B. Andrada, 1975. El cariotipo fundamental en el género *Hippeastrum* Herb. (Amaryllidaceae). *Darwiniana* 19 (2-4): 566-582.
- Naranjo, C.A. y L. Poggio, 1988. A comparison of Karyotype, Ag-Nor bands and DNA content in *Amaryllis* and *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). *Kew Bull.* 42: 317-325.
- Naranjo, C.A., F.H. Arias, F.E. Gil y A. Soriano. 1989. *Bromus pictus* of the *B. setifolius* complex (Section *Pnigma*): numerical taxonomy and chromosome evidence for species rank. *Can. J. Bot.* 68: 2493-2500.
- Naranjo, C.A., M.C. Molina y L. Poggio, 1990. Evidencias de un número básico $x=5$ en el género *Zea* y su importancia en estudios del origen del maíz. *Acad. Nac. Cs. Ex. Fís. Nat. (Buenos Aires)*. Monografía 5: 43-53
- Nevo, E., 1983. Genetic resources of wild emmer wheat: structure evolution and application in breeding. *Proc. 6th Int. wheat Genet. Symp. Kyoto Japan* 421-431.
- Nevo, E., A. Beiles & N. Storch, 1983. Microgeographic edafic differentiation in hordein polymorphisms of wild barley. *Theor. Appl. Genet.* 64: 123-132.
- Núñez, O., 1968. An acetic-haematoxylin squash method for small chromosomes. *Caryologia* 21: 115-119.

- Ohri, D., M.A. Nazeer y M. Pal, 1981. Cytophotometric estimation of nuclear DNA in some ornamentals. *Nucleus* 24: 39-42
- Orgel, L.E. y F.H.C. Crick, 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284: 604-607.
- Ornduff, R. (Ed.). 1967. Index to plant chromosome numbers for 1965. Bureau for Plant Taxonomy and Nomenclature. Utrecht, The Netherlands.
- Ornduff, R. (Ed.). 1968. Index to plant chromosome numbers for 1966. Bureau for Plant Taxonomy and Nomenclature. Utrecht, The Netherlands.
- Ornduff, R. (Ed.). 1969. Index to plant chromosome numbers for 1967. Bureau for Plant Taxonomy and Nomenclature. Utrecht, The Netherlands.
- Ornstein, L., 1964. Disc electrophoresis Y. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121: 321-349.
- Overend, W.G. y M. Stacey, 1949. Mechanism of the Feulgen nucleal reaction. *Nature* 163: 538-540.
- Paiva, J. & M.T. Leitao, 1989. Números cromossómicos para alguns taxa da Africa tropical II. *Bol. Soc. Brot. Ser 2*, 62: 117-130.
- Pal, A., R.P. Singh & M. Pal, 1990. Development and structure of seeds in *Amaranthus hypochondriacus* L. and its wild progenitor *A. hybridus* L. *Phytomorphylogy* 40 (1-2): 145-150 .
- Pal, M., 1964. Chromosome numbers in some Indian Angiosperms. I. *Proc. Ind. Acad. Sci.* 60B: 347-351.
- Pal, M., 1972. Evolution and improvements of cultivated Amaranths III. *Amaranthus spinosus-dubius* Complex. *Genetica* 43: 106- 118.

- Pal, M. & Khoshoo, T. M. 1972. Evolution and improvements of cultivated Amaranths V. Inviability weakness and sterility in hybrids. J. Hered. 63: 78-82.
- Pal, M. & Khoshoo, T. M., 1973a. Evolution and improvements of cultivated Amaranths VI. Cytogenetic relationships in grain types. Theor. Appl. Genet. 43:242-251.
- Pal, M. & Khoshoo, T. M., 1973b. Evolution and improvements of cultivated Amaranths VII. Cytogenetic relationships in vegetable amaranths. Theor. Appl. Genet. 43: 343-350.
- Pal, M. & R.M. Pandley, 1989. Cytogenetics and evolution of grain amaranths. Aspects Pl. Sci. 11: 323-336
- Pal, M., Pandley, R. M. & Khoshoo, T.M. 1982. Evolution and improvements of cultivated Amaranths IX. Cytogenetic relationships between the two basic chromosome numbers. J.Hered. 73: 353-356.
- Palomino, G. & R. Rubí, 1991. Diferencias cromosómicas entre algunas especies y tipos del género *Amaranthus* distribuidos en México. Actas Primer Congreso Internacional del Amarantho (Morelos, Mexico):24
- Panda , R.C., O. Aniel Kumar & K.G. Raja Ran, 1986. The use of seed protein electrophoresis in the study of phylogenetic relationships in Chili pepper. (*Capsicum* L.). Theor. Appl. Genet. 61:665-670
- Pardue, M.L. & J.C. Gall, 1970. Chromosome localization of mouse satellite DNA. Science 168: 1356.
- Payne, W.W., 1976. Biochemistry and species problems in *Ambrosia* (Asteraceae, Ambrosiiae). Plant Syst. Evol. 125: 169-178

- Pogan, E., R. Czapik, A. Jankun & E. Kuta, 1982. Further studies in chromosome numbers of Polish angiosperms. Part. XVI. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 24: 159-189.
- Poggio, L., 1988. Aspectos citogenéticos de los amarantos silvestres y cultivados. Actas de las Primeras Jornadas Nacionales sobre Amarantos. (Santa Rosa, La Pampa): 34-49.
- Poggio, L., 1994. La citogenética en la organización del genoma y la especiación. Mendeliana 10(2): 77-95.
- Poggio, L. y J.H. Hunziker, 1986. Nuclear DNA content variation in *Bulnesia* (Zygophyllaceae). J. Hered. 77: 43-48.
- Poggio, L., S. Botta, E.J. Greizerstein y M.R. Ferrari, 1993. Natural hybridization in *Glandularia*. Darwiniana 32 (1-4): 77-90
- Poggio, L., A.D. Burghardt y J.H. Hunziker, 1989. Nuclear DNA variation in diploid and polyploid taxa of *Larrea* (Zygophyllaceae). Hereditas 63: 321
- Poggio, L. y C.A. Naranjo, 1990. Contenido de DNA y evolución en plantas superiores. Acad. Nac. Cs. Ex. Fís. Nat. Buenos. Aires. Monografía 5:27-37
- Preisler, R.S. & W.F. Thompson, 1981. Evolutionary sequence divergence within repeated DNA families of higher plant genomes. II. Analysis of thermal denaturation. J. Molec. Evol. 17: 85-93.
- Price, H.J., 1976. Evolution of DNA content in higher plants. Bot. Rev. 42: 27-52
- Price, H.J., 1988a. Nuclear DNA content variation within angiosperm species. Evol. Trends in Plants. 2(1): 53-60.

- Price, H.J., 1988b. DNA content variation among higher plants. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 75: 1248-1257.
- Price, H.J., A.H. Sparrow y A.F. Nauman, 1973. Correlations between nuclear volume, cell volume and DNA content in meristematic cells of herbaceous angiosperms. *Experientia* 29: 1028-1029.
- Queiros, R. , 1989. Estudios citotaxonómicos en *Amaranthus* de Portugal. *Lazaroa* 11: 9-17.
- Ray, J.H.S., 1978. Constitutive heterochromatin distribution in monocentric and polycentric chromosomes. *Chromosoma* 66: 341-350.
- Ray, J.H. & S. Venkeshwaran, 1978. Constitutive heterochromatin distribution in monocentric and polycentric chromosomes. *Chromosoma* 66: 341-350.
- Rao y Rai, 1987. Inter and intraspecific variation in nuclear DNA content in *Aedes mosquitoes*. *Heredity* 59: 253-258.
- Raymond, S. & L. Weintraub, 1959. Acrylamide gel as supporting medium for zone electrophoresis. *Science* 130: 711.
- Rees, H. y R.N. Jones, 1972. The origin of the wide species variation in nuclear DNA content. *Int. Rev. Cytol.* 32: 53-92.
- Rees H.,D.D. Shaw y P. Wilkinson, 1978. Nuclear DNA variation among acridic grasshoppers. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.* 202: 517-525.
- Renard, R., J. Lambinon, M. Reekmans, P. van der Veken & M. Govaert, 1983. Nombres chromosomiques de quelques angiospermes du Rwanda, du Burundi et du Kenya. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* 53: 342-371.
- Reveal, J.L. & R. Spellenberg, 1976. Miscellaneous chromosome counts of Western American plants III. *Rhodora* 78: 37-52.

- Rees, H., 1984. Nuclear DNA variation and the homology of chromosomes. In *Plant Biosystematics*. Grant, F.W. (ed.), Academic Press. Toronto. pp. 87-96.
- Rieger, R., A. Michaelis y M.M. Green, 1991. *Glossary of Genetics. Classical and Molecular*. Springer-Verlang 5th edition pp.553.
- Riley, R., 1960. The secondary pairing of bivalents with genetically similar chromosomes. *Nature* 185: 751-752.
- Ris, H. & R.D. Koremberg, 1979. Chromosome structure and levels of chromosome organization. In. *The structure and replication of genetic material*. Prescott, D.M & L. Golstein (ed). New York Acad. Press. pp. 268-361.
- Ritief, A.E. & R. Ruchel, 1977. Histones removed by fixation. Their role in the mechanism of chromosomal banding. *Exp. Cell Res.* 106: 233-237.
- Rohlf, F.J., 1992. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Sistem. ver. 1.7. Dept. Ecol. Evol. State Univ. New York.
- Romero Zarco, C., 1976. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 35: 526-530.
- Rothfels, K & M. Heimburger, 1968. Chromosome size and DNA values in sundews (*Droseraceae*). *Chromosoma* 25: 96-103.
- Sáez, F., 1960. El empleo de la hematoxilina acética o propiónica para el estudio de los cromosomas con la técnica del aplastamiento. *Com. Soc. Biol. Montevideo*, 11-5-1960. Mimeografiado.
- Sauer, J.D., 1950. The grain amaranths: a survey of their history and classification. *Ann. Missouri. Bot. Gard.* 37: 561-632.
- Sauer, J.D., 1955. Revision of the dioecious amaranths. *Madroño* 13: 5-46.

- Sauer, J.D., 1957. Recent migration and evolution of the dioecious amaranths. *Evolution* 11: 11-31.
- Sauer, J.D., 1967. The grain amaranths and its relatives: a revised taxonomic and geographic survey. *Ann. Missouri. Bot. Gard.* 54(2): 103-137.
- Schiff, 1866. Eine rene Reihe organischer diamine. *Justus Liebings Ann. Chem.* 140: 92-137.
- Schmid, M., 1978. Chromosome banding in amphibia. II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microphylidae and Rhacophoridae. *Chromosoma* 68: 131-148.
- Schneld, W. & R. Czaker, 1974. Centromeric heterochromatin and comparison of G banding in cattle, goat and sheep chromosomes (Bovidae). *Cytogenet. Cell Genet.* 13: 246-255.
- Segura-Nieto, M., N. Vázquez Sánchez, H. Rubio Velázquez, L.E. Olguín Martínez, C.A. Rodríguez Nester & L. Herrera Estrella, 1992. Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. *J. Agr. Food Chem.* 40: 1553-1558.
- Sharma, A.K., 1970. Annual Report. 1967-1968. *Res. Bull. Univ. Calcutta (Cytogenetics Lab.)* 2: 1-50.
- Sharma, A.K. & M. Banik, 1965. Cytological investigation of different genera of Amaranthaceae with a view to trace their interrelationships. *Bull. Bot. Soc. Bengal* 19: 40-50.
- Shewry, P.R., H.M. Pratt & B.J. Miflin, 1978. Varietal identification of single seeds of barley by analysis of hordein polypeptides. *J. Sci. Fd. Agric.* 29: 587-596.

- Sidhu, M.K., 1979. Distributional and cytological studies of the weed flora of cultivable fields of Patiala district (Punjab). Ph. D. Thesis. Patiala :1-230.
- Sidhu, M.K. & S.S. Bir, 1987. Karyological studies on weed on cultivable lands in Pujab, India. *Trop. Plant Sci. Res.* 1: 1-13.
- Sivak, A. & S.R. Wolman, 1974. Chromosomal proteins in fixed metaphase cells. *Histochem.* 42: 345-349.
- Smith, G.P., 1976. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossing-over. *Science* 191: 528-535.
- Smithies, O., 1955. Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adults. *J. Biochem.* 61: 629-640.
- Sneath, P.H.A. & R.R. Sokal, 1973. *Numerical Taxonomy: The principles and practice of numerical classification.* Freeman (ed). 359 pp.
- Sparrow, A.H., H.J. Price & A.G. Hunderbrink, 1972. A survey of DNA content per cell and per chromosome in prokaryotic and eukaryotic organisms; some evolutionary considerations. *Brookhaven Symp. Biol.* 23: 452-494.
- Standley, P.C., 1917. Family Amaranthaceae. In *North American Flora.* (The New York Bot. Garden ed.):98-119.
- Stebbins, G. L. 1971. *Chromosomal evolution in higher plants.* Addison-Wesley Publ. Co. 216 pp.
- Strid, A. & R. Franzen, 1981. In *IOPB chromosome number reports LXXIII.* *Taxon* 30: 829-842.
- Subramanyan, K. & N.P. Kamble, 1966. In *IOPB chromosome number reports VII.* *Taxon* 15: 155-163.

- Summer, A.T., 1982. The nature and mechanisms of chromosome banding. *Cancer Genet. Cytogen.* 6: 159-187.
- Swift, H., 1950. The desoxyribose nuclei acid content of animal nuclei. *Physiol. Zool.* 23: 169.
- Swift, H., 1955. Quantitative aspects of nuclear nucleoproteins. *Int. Rev. Cytol.* 2: 25
- Sybenga, J., 1994. *Cytogenetics in Plant Breeding.* Springer-Verlag 468pp
- Tandom, S.L. & M. Tawakley, 1970. In IOPB chromosome number reports XXVI. *Taxon* 19: 264-269.
- Tercero, J.A., A. Bernardo & N. Jouvé, 1991. Encoding genes for endosperm proteins in *Hordeum chilense*. *Theor. Appl. Genet.* 81: 127-132.
- Teoh, S.B. y H. Rees, 1976. Nuclear DNA amounts in populations of *Picea* and *Pinus* species. *Heredity* 36(1): 123-137.
- Thomas, C.A., 1971. The genetic organization of chromosomes. *Ann. Rev. Genet.* 5: 237-256.
- 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.
- Tiselius, A., 1937. A new apparatus for electrophoresis analysis of colloidal mixtures. *Trans. Faraday Soc.* 33: 524-531.
- Tomooka, N., C. Lairungreang, P. Nakeeraks, Y. Egawa & C. Thavarasook, 1992. Center of genetic diversity and dissemination pathways in mung bean deduced from seed protein electrophoresis. *Theor. Appl. Genet.* 83: 289-293.

- Uhrikova, A., 1974. In index to chromosome numbers of Slovakian Flora. Part 4. Acta Fac. Rerum Nat. Univ. Comeniana Bot. 23: 1-23.
- Van't Hof, J., 1965. Relationships between mitotic cycle duration, S period duration and the average rate of DNA synthesis in the rood meristem of several plants. Experimental Cell Res. 39: 48-58.
- Van't Hof, J., y A.H. Sparrow, 1963. A relationships between DNA content, nuclear volume, and minimum mitotic cycle time. Proc. Natl. Acad. Sci. 49: 879-902.
- Vaughan, J.G. & K.E. Denford, 1968. An acrylamide gel electrophoretic study of the seed proteins of *Brassica* and *Sinapsis* species with special reference to their taxonomic value. J. Exp. Bot. 19: 724-732.
- Vaughan, J.G. & A. Waite, 1967. Comparative study of the seed proteins of *Brassica campestris*, *Brassica olareaceae* and *Brassica nigra*. J. Exp. Bot. 17: 332-343.
- Velasco Lozano, A.M.L. y D. Heyden, 1989. El uso y la representación del amaranto en la época prehispánica según las fuentes históricas y pictóricas. En El Amaranto su Cultivo y Aprovechamiento: 8-22.
- Walton, P.D., 1968. The use of the genus *Amaranthus* in genetic studies. J. Hered. 59: 76-78.
- Ward, D.E., 1984. Chromosome counts from Nuevo Mexico and Mexico. Phytologia 56: 55-60.
- Ward, D.E. & R.W. Spellenberg, 1986. Chromosome counts of angiosperms of Western North America. Phytologia 61: 119-125.

- Walsh, J.B., 1987. Perspective of tandem arrays: implications for satellite and simple-sequence DNAs. *Genetics* 115: 553-567.
- Wallace, R.S. & D.E. Fairbrothers, 1986. Isoelectrically focussed seed proteins seed proteins of populations of *Opuntia humifusa* RAF (Cactaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 14: 365-369.
- Wolff, G., 1980. Investigations of the relations within the family Papilionaceae of the basis of electrophoretic banding patterns. *Theor. Appl. Genet.* 57: 225-232.
- Xu, Y., 1987. Studies on the chromosome number of some species of *Amaranthus* plant. *Grassl China* 3: 48-50.