

Tesis de Posgrado

Tamaño del genoma, heterocromatina, polimorfismo numérico y herencia de cromosomas B en razas nativas del maíz

Rosato, Carmen Luisa Marcela

1997

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:

Rosato, Carmen Luisa Marcela. (1997). Tamaño del genoma, heterocromatina, polimorfismo numérico y herencia de cromosomas B en razas nativas del maíz. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2938_Rosato.pdf

Cita tipo Chicago:

Rosato, Carmen Luisa Marcela. "Tamaño del genoma, heterocromatina, polimorfismo numérico y herencia de cromosomas B en razas nativas del maíz". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2938_Rosato.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

***TAMAÑO DEL GENOMA,
HETEROCROMATINA, POLIMORFISMO
NUMÉRICO Y HERENCIA DE CROMOSOMAS
B EN RAZAS NATIVAS DE MAÍZ***

Carmen Luisa Marcela Rosato

**Director: Dra. Lidia Poggio
Co-Director: Dr. Carlos A. Naranjo**

Lugares de trabajo:

**Instituto Fitotécnico de Santa Catalina
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales-UNLP,
Centro de Investigaciones Genéticas (UNLP - CONICET - CIC)**

**Laboratorio de Genética,
Departamento de Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
UBA**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

1997

42

***GENOME SIZE, HETEROCHROMATIN,
B CHROMOSOME NUMERICAL
POLYMORPHISM AND B TRANSMISSION
RATE IN NATIVE RACES OF MAIZE***

A MIS PADRES

Agradecimientos

A mis directores, les quiero expresar un especial y cálido agradecimiento por que me brindaron la posibilidad de desarrollarme en la investigación científica transmitiéndome en todo momento sus conocimientos y experiencias, que contribuyeron especialmente en mi formación durante estos años. Además del entusiasmo que siempre tuvieron durante la realización de las investigaciones, como en la discusión de sus resultados y la redacción de la Tesis. Gracias !! por que juntos concretamos este gran deseo.

Al Ingeniero Julián Cámara Hernández (Cátedra de Botánica, Facultad de Agronomía, UBA) por su colaboración en la determinación de las poblaciones estudiadas, el legado de parte del material empleado proveniente del banco de Germoplasma del laboratorio de Recursos Genéticos "N. J. Vauillé" en la presente Tesis.

A la Doctora María Jesus Puertas (Dpto. de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense, España) deseo agradecerle su participación y el estímulo que nos ha brindado en los trabajos que hemos realizado.

Al Instituto Fitotécnico de Santa Catalina (FCAyF) deseo agradecerle todas las facilidades ofrecidas, como el espacio que me brindó para aprender y disfrutar de mi trabajo.

Al CONICET y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) por los subsidios otorgados a mis directores que permitieron la realización de la Tesis.

Al Personal No docente del Instituto Fitotécnico de Santa Catalina deseo expresarle mi agradecimiento por su colaboración, especialmente al Sr. Enrique Micheli y a Diego Fink.

A mis compañeros del Instituto y del Area de Genética Evolutiva por el apoyo que siempre me brindaron. Además quiero agradecer en especial a Pablo Rosi y al Dr Eduardo Greinzein por la colaboración y sugerencias durante la redacción de la Tesis y a el asesoramiento que me brindaron las Dras María Isabel Remis y Viviana Confalonieri.

A mis amigos.

A mi familia.

A Milca y Asdrubal porque no se comieron ninguna hoja de la Tesis.

A Mauricio .(era inevitable)

A todos Gracias !!!



La familia Mamani es cultivadora de maíz en el Dpto. de Trancas, Pcia. de Tucumán. Gracias a ellos como a muchos otros cultivadores del NO. argentino, que tan gentilmente nos ofrecieron sus maíces, pudimos realizar 'los estudios'.

INDICE

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 6 |
| INTRODUCCIÓN: | |
| TAMAÑO DEL GENOMA | 12 |
| HETEROCROMATINA | 17 |
| Definición y composición..... | 17 |
| Técnicas de tinción para su detección..... | 18 |
| Efectos de la heterocromatina..... | 21 |
| CROMOSOMAS B | 22 |
| Características generales..... | 22 |
| Polimorfismo numérico..... | 24 |
| Herencia de los cromosomas B..... | 27 |
| Genotipos de transmisión..... | 29 |
| ANTECEDENTES EN EL GENERO ZEA..... | 35 |
| Tamaño del genoma..... | 35 |
| Tamaño del genoma - Altitud..... | 35 |
| Relación entre el tamaño del genoma, heterocromatina, cromosomas B y altitud..... | 36 |
| Heterocromatina: nudos(<i>Knobs</i>) - bandas C..... | 38 |
| Polimorfismo numérico para cromosomas B | 40 |
| Herencia de los cromosomas B en maíz..... | 41 |
| OBJETIVOS | 43 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| MATERIALES | 46 |
| METODOLOGÍA | |
| A. Análisis del complemento cromosómico..... | 50 |
| B. Determinación del contenido de ADN..... | 50 |
| B.1) Técnica de Tinción y determinación..... | 50 |
| B.2) Calibración del Testigo <i>opaco-2</i> | 52 |
| C. Técnicas de bandeo cromosómico..... | 52 |
| C.1). Bando C..... | 52 |
| C.2) Bando fluorescente..... | 53 |
| D. Experimento para analizar el contenido de ADN y Polimorfismo numérico para Bs..... | 54 |
| E. Experimento para analizar la dosis de Bs y el contenido de ADN | 55 |
| F. Análisis de la tasa de transmisión femenina del cromosoma B..... | 56 |
| F.1) Realización de cruzamientos f. 1B x m. 0B | 56 |
| F.2) Experimento de selección mediante cruzamientos controlados..... | 58 |
| G. Análisis estadístico..... | 61 |
| RESULTADOS | |
| POLIMORFISMO NUMÉRICO PARA BS EN POBLACIONES..... | 64 |
| Frecuencia media de Bs- altura de cultivo..... | 68 |
| TAMAÑO DEL GENOMA | 70 |
| Tamaño del genoma - Frecuencia media de Bs..... | 73 |
| Dosis de cromosomas B - Contenido de ADN..... | 74 |
| ANALISIS DE LA HETEROCROMATINA | 77 |
| Caracterización mediante técnicas de bandeo fluorescente y C..... | 77 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------|------------|
| Heterocromatina y Tamaño del genoma..... | 79 |
| Heterocromatina, Número medio de Cromosomas B y altura..... | 82 |
| Heterocromatina y Dosis de Cromosomas B | 83 |
| TASA DE TRANSMISIÓN FEMENINA DE CROMOSOMAS B | 97 |
| Tasa de transmisión en la G0 | 97 |
| Tasa de transmisión en la G1 | 99 |
| 1. Clase de alta tasa de transmisión (G1fa) | 99 |
| 2. Clase de baja tasa de transmisión (G1fb) | 100 |
| Tasa de transmisión en la G2 | 101 |
| 1. Clase de alta tasa de transmisión (G2fa) | 102 |
| 2. Clase de baja tasa de transmisión (G2fb) | 103 |
| DISCUSIÓN | |
| POLIMORFISMO NUMÉRICO PARA CROMOSOMAS B | |
| EN POBLACIONES NATIVAS DE MAÍZ | 107 |
| Polimorfismo para cromosomas B y altura de cultivo | 108 |
| TAMAÑO DEL GENOMA EN POBLACIONES NATIVAS DE MAÍZ | |
| Contenido de ADN y Altura de cultivo..... | 109 |
| Contenido de ADN y Frecuencia poblacional de Bs | 111 |
| Variación del tamaño del genoma en relación a la dosis de Bs..... | 112 |
| HETEROCROMATINA | |
| Polimorfismo y Politipismo para heterocromatina..... | 114 |
| Heterocromatina, Cromosomas B y Tamaño del genoma | 119 |
| TRANSMISIÓN FEMENINA DE LOS CROMOSOMAS B | |
| CONCLUSIONES | |
| BIBLIOGRAFÍA..... | |
| | 134 |

RESUMEN

Se realizaron estudios citogenéticos en poblaciones nativas de maíz del norte argentino adaptadas a diferentes alturas de cultivo. Los mismos consistieron en: determinación del polimorfismo numérico para cromosomas B y del tamaño del genoma, caracterización de la heterocromatina mediante técnicas de bandeos cromosómicos y la relación de éstos con parámetros geográficos como la altitud. Además, se estudió la tasa de transmisión femenina de cromosomas B en una población de la raza *Pisingallo*.

Se estudiaron 21 poblaciones (1120 individuos) cultivadas a diferentes altitudes (80-3620m). Se encontró polimorfismo numérico para cromosomas B en 19 poblaciones. Las frecuencias media de individuos portadores de cromosomas B varían entre 0 y 94%. El análisis de correlación entre el número medio de cromosomas B y la altitud indica que se correlacionan positivamente.

El tamaño del genoma (contenido de ADN) fue determinado en 17 poblaciones (107 individuos). Con la finalidad de estudiar la variación del contenido de ADN en los cromosomas A (A-ADN) independientemente de la variación aportada por los Bs, ésta estimación fue llevada a cabo en plantas sin Bs. El rango de variación hallada entre las poblaciones estudiadas fue del 36% (5,00 - 6,8 pg). El contenido de ADN (A-ADN) se correlaciona negativamente con la altura de cultivo y el número medio de Bs. La variación clinal hallada del contenido de ADN y la consecuente correlación con la frecuencia de cromosomas B sobre un gradiente altitudinal tendría un significado adaptativo.

En cuatro poblaciones se estudió el contenido de ADN en individuos con diferente dosis de cromosomas B. Se encontró que, dependiendo de la población analizada, la presencia de cromosomas B no siempre incrementa el contenido de ADN respecto a los individuos sin cromosomas B de la misma población. Con el fin de dilucidar si esto se debe a un efecto de enmascaramiento producido por la variación en el contenido de heterocromatina, se analizaron individuos con distinta dosis de cromosomas B mediante la técnica de bandeado fluorescente utilizando DAPI como fluorocromo. Se encontró, en una población, que la distribución del número de bandas no es independiente de la presencia de cromosomas B. El resultado hallado indica que en individuos portadores de cromosomas B, la variación del número de bandas heterocromáticas estaría enmascarando la presencia de los cromosomas B, al medir el contenido de ADN. Debido a éste resultado existiría una estrecha relación entre el tamaño del genoma, el contenido de heterocromatina y los cromosomas B. En cada población, la frecuencia de Bs podría estar limitada por la variación del contenido de A-ADN o viceversa. Además la distribución de frecuencias en el número de bandas heterocromáticas está relacionada con la presencia de cromosomas B y por lo tanto, los individuos con Bs poseen en general menor número de bandas heterocromáticas en sus cromosomas A, que los individuos sin Bs. Por otro lado, se encontró una correlación altamente significativa entre el número de zonas heterocromáticas y la frecuencia de cromosomas B en 11 poblaciones. Estos resultados sugieren que, en cada población, el contenido de ADN total posee un límite máximo y el mismo sería alcanzado mediante un balance entre el contenido de heterocromatina (en los As) y la dosis de cromosomas B.

Por otro lado, con la finalidad de conocer la tasa de transmisión de los cromosomas B por vía materna se realizaron cruzamientos entre plantas f.1B x m. 0B en una población de la raza *Pisingallo*. Se encontró una variación para la tasa de transmisión de los Bs en la **G0**. Un experimento de selección con cruzamientos controlados el cual consistió en seleccionar aquellas progenies que presentaron las menores y las mayores tasas de transmisión durante dos generaciones. Los resultados obtenidos en la **G1** indican la presencia de dos diferentes grupos de plantas: alta y baja tasa de transmisión de cromosomas B por vía materna y demuestra la existencia de polimorfismo para genes que controlan la tasa de transmisión de los cromosomas B. En la **G2** los grupos de alta y baja tasa de transmisión se mantuvieron separados, sin embargo, no fue posible obtener mayor progreso selectivo que el obtenido en la **G1**. Estos resultados indican que habría un componente genético en la variación obtenida para la tasa de transmisión de los cromosomas B en la generación parental (**G0**). El grupo seleccionado para alta tasa de transmisión del cromosomas B por vía materna corresponde a genotipos que lo transmiten de manera mendeliana en cambio, el grupo seleccionado para baja tasa de transmisión lo transmiten a una tasa menor. Es decir que, sólo habría genes "anti-B" que podrían actuar promoviendo la pérdida meiótica del univalente B en la meiosis femenina o la migración del B hacia las megasporas no funcionales o ambos fenómenos.

Los mecanismos de acumulación descritos para maíz son suficiente para explicar el mantenimiento del polimorfismo de los Bs en las poblaciones, sin embargo, estos mecanismos no son suficiente para explicar las diferentes

frecuencias de cromosomas B en las poblaciones. Diferentes frecuencias de los alelos que controlan la tasa de transmisión de cromosomas B podrían explicar las frecuencias de cromosomas B hallada en las diferentes poblaciones.

Palabras claves: Maíz, *Zea mays ssp. mays*, poblaciones nativas de maíz, tamaño del genoma, Contenido de ADN, Heterocromatina, Cromosomas B, Tasa de transmisión de cromosoma B.

ABSTRACT

Maize native populations from northern Argentina adapted to different altitudes were cytogenetically studied. These studies consisted in: determination of B-chromosome numerical polymorphism, DNA content, characterisation of heterochromatin by techniques of chromosome banding and the study of the relationship with altitude of cultivation. Moreover, the transmission rate of B-chromosome was studied in a population of *Pisingallo* race.

Twenty one native populations (1120 individuals) cultivated at different altitudes (80-3620m) were studied. A numerical polymorphism for B-chromosomes was found in 19 populations. The mean frequencies of individuals with Bs varied from 0 to 94%. A highly significant positive correlation between the mean number of Bs per plant and altitude of cultivation was demonstrated.

The genome size (DNA content) was determined in 17 populations (107 individuals). With the aim to study the variation in DNA content of A-chromosomes (A-DNA) independently from the variation supplied by the Bs, this estimation was performed in plants without Bs. The range of variation was 36% (5,00 to 6,8 pg) among studied populations. A-DNA content was negatively correlated with both altitude of cultivation and mean frequency of Bs. The clinal variation of A-DNA content found in individuals without Bs and the consequent inverse correlation of B frequencies over an altitudinal gradient could have an adaptive significance.

The genome size in individuals with different doses of Bs in 4 populations was studied as well. It was found that the presence of Bs did not always increase the DNA content respect to individuals without Bs and it depended on each population. With the aim to know if this phenomenon was caused by a masking effect produced by the variation in heterochromatin amount, individuals with different B-chromosome doses were studied by means of fluorescent banding with DAPI. It was found that the distribution of number of bands is not independent of the presence of B-chromosomes. The found result indicates that in individuals carrying B chromosomes a variation in the number of heterochromatic bands would be masking the B chromosome presence in the DNA content. These results indicate that there is a close interrelationship between the DNA content, heterochromatin amount and B-chromosomes. In each population, the B-chromosome frequency would be limited by the variation of DNA content, or viceversa. Moreover, the distribution of frequency in number of heterochromatic bands is related with the presence of B-chromosomes and, therefore, individuals with Bs have fewer bands than individuals without Bs in the A-chromosomes. On the other hand, a highly significant negative correlation between the number of knobs and the mean number of Bs in eleven populations was found. These results suggest that, in each population, there would be a maximum range of mass of nuclear DNA and this could be reached balancing both heterochromatin amount and B-chromosomes.

With the aim to know the transmission rate (TR) of the B chromosomes on the female side, crosses between f.1B X m. 0B plants were carried out in a population (**VAV 6313**) of the race *Pisingallo*. Variation of B-chromosome

transmission rate in G₀ was found. An experiment of selection with controlled crosses was carried out which consisted in selecting those progenies of f. 1B X m. 0B crosses showing the highest and lowest TR along two generations. The results obtained in G₁ indicate the presence of two different groups of plants, high and low B TR on the female side, and demonstrate the existence of polymorphism for genes controlling B TR. In G₂ the high and low B-TR groups were kept up isolated, nevertheless it was not possible to obtain more selective progress than that obtained in G₁. This indicates that there is a genetic component to the variation of B TR obtained in G₀. The selected groups for high female B-TR corresponds to genotypes that transmit it in a mendelian inheritance, whereas the selected group for low B-TR transmit it at a lower rate than that in the mendelian inheritance. In other words, there are "anti-B genes" which might act on the propensity for the meiotic loss of the B univalent, or on the nonrandom migration of the B toward the non-functional megaspore, or both.

Drive mechanisms are sufficient to account for the maintenance of B polymorphism in maize populations. However, these mechanisms cannot account for the differences of B frequencies in different populations. Different frequencies of the alleles controlling B-TR may account for B frequency in different populations of maize.

Key words: Maize, *Zea mays ssp. mays*, maize native populations, genome size, DNA content, heterochromatin, B chromosomes, B chromosome transmission rate.

INTRODUCCIÓN

TAMAÑO DEL GENOMA

En las angiospermas el contenido de ADN, por genoma haploide no replicado, en especies diploides varía desde 0,2 pg en *Arabidopsis thaliana* (Cruciferae) hasta 89.5 pg en *Fritillaria davisii* (Liliaceae), pero si se tiene en cuenta a las especies poliploides la variación es aún mayor, por ejemplo, *Fritillaria assyriaca* posee 127.4 pg (Bennett and Smith, 1976, Bennett and Leitch, 1995). Desde 1950, mediante diferentes métodos, se ha estimado el tamaño del genoma en especies animales y vegetales. Swift, en ese mismo año, introdujo el término **valor C** (constancia) para referirse al contenido de ADN por genoma haploide no replicado de un individuo (Bennett and Leitch, 1995).

A medida que se fue conociendo el contenido de ADN en distintos organismos, se observó que la variación encontrada en eucariotas y aún entre especies del mismo grupo taxonómico, no se correlacionaba con la complejidad orgánica y genética. Thomas, en 1971, denominó a éste fenómeno **paradoja del valor C**. Posteriormente se encuentra que el genoma está compuesto principalmente por familias de secuencias repetidas dispuestas en tandem o dispersas en el genoma. Flavell (1986) demuestra que la variación del contenido de ADN total entre especies es debida principalmente a la ganancia o pérdida de secuencias repetidas del ADN. Este mismo autor en 1986 propone

que cambios en el ADN repetido es responsable de la mayoría de los cambios del tamaño y estructura del cromosoma durante la evolución y divergencia de las especies. Las secuencias de ADN repetidas han sido denominada por diferentes autores como: **ADN sin sentido, egoísta, parasítico, ignorante** (Doolittle and Sapienza, 1980; Orgel, Crick and Sapienza, 1980, Dover, 1980). Una hipótesis para explicar la paradoja sugiere que muchas secuencias de ADN no poseen función específica (Orgel and Crick, 1980; Doolittle and Sapienza, 1980). Dover (1982) propone que éstas secuencias repetidas egoístas, son fijadas y distribuidas en el genoma como consecuencia del impulso molecular. Los autores antes mencionados explican la paradoja sugiriendo que muchas secuencias de ADN son sin sentido, sin función específica y que la acumulación de tales secuencias no poseen notorios efectos fenotípicos ni valor adaptativo para la célula o el organismo (Price 1988).

Otros autores, en cambio, consideran que las secuencias repetidas contribuirían al potencial evolutivo de las poblaciones (ver revisiones Price, 1988; Bennett and Leitch, 1995). Esta hipótesis se basa en las correlaciones halladas por diferentes autores entre el contenido de ADN y caracteres celulares, orgánicos y ecológicos. En muchos organismos la variación en el contenido de ADN total esta correlacionada positivamente con la longitud o volumen cromosómico, área y volumen celular, porcentaje de heterocromatina, duración del ciclo meiótico y mitótico, tiempo mínimo de generación, rango de

cultivo y distribución geográfica (altitud - latitud) (revisiones Grant, 1987, Bennett, 1987, Price, 1988; Poggio y Naranjo, 1990; Bennett and Leich, 1995)

Se han citado varios ejemplos de correlación entre el contenido de ADN y distribución geográfica que sugieren que fuerzas selectivas estarían determinando la relación entre el contenido de ADN, época y estación de crecimiento (Bennett, 1987). En *Larrea*, por ejemplo, el contenido de ADN y nivel de ploidía aumenta hacia las zonas de mayor aridez (Poggio et al. 1989). En el género afín *Bulnesia*, las especies con mayor contenido de ADN habitan zonas desérticas (Poggio and Hunziker, 1986). En especies cultivadas se han descrito clines ADN - latitud y ADN - altitud atribuidas a la selección impuesta por el hombre (Bennett, 1987; Price, 1988). Todas éstas relaciones sugieren que el tamaño del genoma posee significado adaptativo y que el contenido de ADN determinaría el fenotipo no sólo por la expresión de su contenido génico sino por los efectos físicos de su masa y/o volumen. Bennett ,en 1972, creó el término **nucleotipo** para definir a aquellos aspectos del ADN nuclear que afectan al fenotipo independientemente de su información (Bennett, 1987). Muchos estudios señalan que en las plantas superiores los efectos de la variación del contenido de ADN son predecibles, adaptativos y con significado evolutivo (Price, 1988, Bennett, 1987), además son importantes para analizar el potencial de desarrollo de plantas útiles, silvestres y cultivadas (Poggio y Naranjo, 1990).

En muchos estudios se ha encontrado variación intraespecífica en el contenido de ADN. Si se descarta la variación debida a aneuploidía, poliploidía, cromosomas sexuales y cromosomas accesorios, ésta variación podría explicarse por la existencia de polimorfismo o politipismo para secuencias de ADN repetido. Muchas veces esto puede evidenciarse fácilmente analizando el polimorfismo o politipismo para zonas heterocromáticas que, como se verá más adelante, se corresponden con zonas de ADN altamente repetidas en tandem. Esta variación intraespecífica no es general, existen ejemplos de constancia en el contenido de ADN, entre cultivares de especies silvestres como *Hordeum vulgare*, *Vicia sativa*, o en especies silvestres de *Triticum monococcum* (Bennett and Leitch, 1995). El género *Zea* como se verá más adelante, es uno de los ejemplos más notorios de variabilidad intraespecífica. Como fue mencionado anteriormente ésta variación puede deberse a diferencias en el porcentaje de heterocromatina (Rayburn et al. 1985, Tito et al. 1991), en el número de familias de secuencias repetidas del rDNA (Cullis and Cleary, 1986, Walbot and Cullis, 1985; Cavallini and Natali, 1990) y proliferación de elementos transponibles (Walbot and Cullis, 1985; Price, 1988a).

Es interesante señalar, además que las secuencias de ADN pueden cambiar rápidamente como respuesta a estres genético y ambiental (Walbot y Cullis, 1985). Se ha descrito en la variedad Stormont Cirris de lino (*Linum usitatissimum*) variaciones rápidas en el contenido de ADN en semillas desarrolladas bajo estres, es decir, que en los suelos con altas concentraciones

de nitrógeno y elevadas temperaturas las plantas poseen un contenido de ADN mayor (16%) que las desarrolladas en suelos con altas concentraciones de fosforo. Esto significa que en una generación se inducen cambios heredables en el contenido de ADN, el mismo se debe a diferencias en el número de secuencias repetidas y genes ribosomales 5S (revisiones Walbot and Cullis, 1985; Price, 1988; Cullis y Cleary, 1986). En *Microseris douglasii* y *M. bigelovii* (revisión Price, 1988) se encontró que la calidad del suelo y la longitud de la estación de crecimiento son factores importantes en la evolución del tamaño del genoma. Recientemente en el girasol (*Helianthus annuus*) también se ha encontrado inestabilidad del contenido de ADN inducido por el ambiente. Johnston et al. (1996) determinan que las semillas de girasol que se desarrollan con altos niveles de nitrógeno presentan variación en el contenido de ADN y postulan que la calidad y/o cantidad de luz podría estar influenciando la inestabilidad determinada en el contenido de ADN. Price y Johnston (1996) prueban la hipótesis antes mencionada y sugieren que el fitocromo podría estar involucrado en la regulación del contenido de ADN en el girasol. Una forma de estrés genético es la combinación de genomas diferentes. Por ejemplo líneas aloplásmicas de maíz las cuales poseen núcleo de maíz y citoplasma de teosinte presentan mayor contenido de ADN que las mismas líneas en su propio citoplasma. Estos resultados sugieren que el citoplasma sería también una fuente de estrés que induce cambios en el contenido de ADN en el núcleo de maíz. En éste caso se ha observado que el ADN se incrementa en las zonas heterocromáticas (Mazoti, 1987, Poggio et al. enviado).

Los ejemplos mencionados anteriormente de inestabilidad del contenido de ADN apoyan el concepto de la plasticidad o fluidez del genoma debido a que experimenta rápidos cambios genómicos mediante amplificación, delección y divergencia de secuencias repetidas de ADN (Walbot and Cullis, 1985; Dover, 1982; Flavell, 1980). La habilidad del genoma de responder a los factores ambientales podría ser una estrategia para su adaptación a los cambios ambientales (Walbot and Cullis, 1985; Johnston et al., 1996 Price and Johnston, 1996).

HETEROCROMATINA

Definición y Composición

El término *heterocromatina* fue utilizado por primera vez por Heitz en 1928, para referirse a segmentos de cromosomas o , en algunos casos, a cromosomas enteros que permanecían en estado condensado durante la interfase y tenía el aspecto de un cromocentro. Por lo tanto, correspondería a una definición de tipo morfológico (Verma, 1988).

La definición original del término heterocromatina corresponde a la heterocromatina constitutiva, ésta última comprende secuencias no codificantes y que no se transcriben. Según Verma (1988) la heterocromatina representaría

un tipo diferente más que un estado de la cromatina. Se puede distinguir dos clases de heterocromatina: la heterocromatina constitutiva y la heterocromatina facultativa. Pero Verma (1988) considera, en cambio, que la separación en dos clases no es conveniente; y entonces la utilización del término heterocromatina para describir a la eucromatina facultativamente inactiva no sería necesario porque corresponde a eucromatina condensada que posee ADN codificante temporalmente y reversiblemente inactivado. Aún no se ha determinado cual de las dos definiciones es la más conveniente.

La heterocromatina constitutiva se compone de secuencias altamente repetidas (secuencias repetidas en tandem en decenas de miles a millones de copias). Sin embargo, se conocen casos, por ejemplo, en humanos, en los cuales el ADN altamente repetido no es el único componente y que fracciones no repetidas de ADN podrían estar también incluidas en la heterocromatina constitutiva (Sumner, 1990).

Técnicas de tinción para su detección

Existen algunas técnicas que producen una respuesta diferencial en las regiones eucromáticas y heterocromáticas de los cromosomas condensados en metafase y núcleos en interfase, una de ellas es la técnica de bandeo C que permite la detección de la heterocromatina constitutiva. Sin embargo existen casos donde la heterocromatina no es evidenciada por ésta técnica, por ejemplo, no todas las especies animales analizadas presentan correspondencia

entre la heterocromatina evidenciada por su condensación en la profase meiótica y la presencia de banda C. Por lo tanto, es un error definir a toda la heterocromatina constitutiva solamente en términos de su reactividad al método de bandeado C. Por otro lado, no se conocen casos en los cuales el material que da banda C⁺ no corresponda a heterocromatina (Sumner, 1990).

El mecanismo de bandeado C involucra una remoción diferencial del ADN. Holmquist, en 1979, describe los procesos químicos responsables de la pérdida del ADN durante el bandeado C, los mismos son: tratamiento ácido, tratamiento alcalino e incubación con solución salina. Mediante el primer tratamiento se depurina el ADN pero no se produce ruptura de los sitios depurinados. El tratamiento alcalino causa ruptura del sitio apurínico además de desnaturalización del ADN irreversiblemente. La extracción del ADN depurinado ocurre durante la incubación con la solución salina caliente como resultado de una β eliminación del sitio depurinado llevando a una ruptura de la cadena de ADN. Las evidencias indican que la cromatina condensada es depurinada más lentamente que la cromatina dispersa (esto fue corroborado citológicamente mediante la tinción con Feulgen). Posteriormente se demostró que la banda C está protegida de la digestión con DNAasa por la presencia de proteínas no-histónicas estrechamente unidas al ADN las cuales restringen el acceso de la enzima pero no de los agentes utilizados en la técnica de bandeado C. Se considera que la fuerte unión del ADN a las proteínas en la banda C es un

mecanismo posible que permite explicar la extracción diferencial del ADN de los cromosomas (Sumner, 1990).

Las técnicas de bandeo fluorescente que permiten conocer la composición de la heterocromatina utilizan fluorocromos que son específicos para secuencias de ADN ricas en A+T o G+C. Los fluorocromos descriptos específicos para secuencias ricas en A+T son: Hoechst 33258 [2,2-(4-hydroxyphenyl)-6-benzimidazolyl-6-(1-methyl-4-piperazyl)-benzimidazol-trihydrochloride], DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole), DAPI [4'-6-bis(2'-imidazolinnyl-4'-5'-H)-2-phenylindole), Dibutil proflavina, Daunomicina, Adriamicina y Quinacrina. Todos se unen al ADN en el surco menor excepto los tres últimos que se intercalan. Los fluorocromos que son específicos para secuencias de ADN ricas en G+C son: los antibióticos Cromomicina A₃ (CMA), Mitramicina y Olivomicina, que también se unen en el surco menor del ADN. Los más utilizados son Hoechst 33258, DAPI, CMA y Mitramicina. Se pueden utilizar en combinación dos fluorocromos con diferente especificidad como, por ejemplo, DAPI y CMA para producir un patrón de bandas complementario simplemente con el cambio de la longitud de onda de excitación. Se ha comprobado que con ésta combinación no hay interacción significativa entre los fluorocromos. También se puede combinar sustancias no fluorescente con especificidad de base opuesta al fluorocromo utilizado, por ejemplo, el antibiótico Distamicina A (A+T específico) conjuntamente con el fluorocromo

CMA. El resultado que se obtiene es un mayor contraste del patrón de bandeo producido por el fluorocromo (Sumner, 1990).

Efectos de la heterocromatina

Es conveniente distinguir entre las "funciones" y "efectos" de la heterocromatina. El término "función" implica que la heterocromatina está presente para producir los resultados observados en cambio el "efecto" es un término más neutro y no implica una correlación funcional directa, es decir, que los efectos que se observen, tanto a nivel somático como en la línea germinal, no implica que sean sus reales funciones. Los efectos observados en algunos organismos fueron tanto en el soma como en la línea germinal. Los efectos somáticos citados en algunos organismos son: apareamiento ectópico, efectos de posición, efectos en el comportamiento del centrómero y efectos nucleotípicos. Los efectos en la línea germinal son sobre tres procesos meióticos importantes: el apareamiento, la recombinación y la segregación dado que tiene influencia sobre el apareamiento homólogo y no homólogo, formación y redistribución de quiasmas, y la segregación cromosómica (Verma, 1988).

CROMOSOMAS B

Características generales

Los cromosomas B son cromosomas extras, no esenciales para el organismo, que no recombinan con ningún miembro del complemento normal (A) y tienen modos de herencia irregulares y no-Mendelianos (Jones, 1995, Jones and Rees, 1982).

Morfológicamente los B se distinguen de los A, generalmente son más pequeños y puede hallarse una variación numérica y morfológica entre y dentro de los individuos (Jones, 1995).

Randolph (1941) resume en su trabajo como los cromosomas B fueron identificados en maíz. Este autor hace referencia a que Kuwada ,1911, 1915, fue quién describió por primera vez el complemento cromosómico del maíz formado por 24 cromosomas. Luego, en 1919 reconoce que el número prevaleciente es 20 cromosomas y que las progenies con un número mayor poseen un número variable de cromosomas. Luego, Longley, en 1927, es quién estudia las características y comportamiento de los cromosomas extras. Finalmente Randolph, en 1928, fue el primer autor en utilizar el término

'cromosoma B', para identificar los cromosomas extras, supernumerarios presentes en maíz.

Sin embargo, Jones (1995) comenta que quienes descubrieron la existencia de los cromosomas accesorios fueron Wilson ,en 1906, en el insecto *Metapodius* sp y Stevens ,en 1908, en los coleópteros *Diabrotica soror* y *D. punctata*. Éste último autor describió la presencia de pequeños y adicionales cromosomas supernumerarios que aparecían en número variable en aproximadamente el 50% de la colección de coleópteros.

Hasta el momento, se ha descrito la presencia de cromosomas B en 1372 especies vegetales, de las cuales 12 especies corresponden a gimnospermas y el resto a angiospermas, encontrándose en éstas últimas tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas. En las plantas se encuentran en cualquier nivel de ploidía pero sólo restringida a aquellas que presentan reproducción cruzada. También se los ha descrito en algunos helechos y hongos (Jones, 1995). En los animales se encuentran distribuidos principalmente en los insectos (361 especies) y en los vertebrados (55 especies) y en algunas especies de platelmintos y moluscos (Jones and Rees, 1982).

Los cromosomas B poseen muy pocos genes funcionales. Se ha encontrado en algunas especies, como *Crepis capillaris*, *Brachycome*

dichromosomatica y *Hepatica nobilis*, genes rRNA. Los mismos fueron detectados por la capacidad de los Bs de organizar un nucléolo extra, la tinción con plata e hibridación "in situ (Jones, 1995). Se describió en *Haplopappus gracilis* (Jackson and Newmark, 1960), que un gen que determina el color del aquenio se encuentra en los Bs; éste hallazgo está basado en la observación de pocas plantas y no se han realizado experimentos de cruzamientos ni se ha evidenciado la segregación del carácter para confirmar estas observaciones (Jones, 1995). Resulta ser un caso interesante el gen Pda6 localizado en el cromosoma B del hongo *Nectria haematococca*, que le confiere resistencia antibiótica a la fitoalexina pisatina producida por el huésped *Pisum sativum* (Miao, Covert and Van Etten, 1991). En *Scilla autumnalis* los cromosomas B poseen un efecto desrepressor de la expresión del locus isoenzimático Est-1 localizado en los cromosomas A (Oliver et al., 1982).

Los Bs, además, son portadores de la información genética que controlan su propia transmisión, como se discutirá en la sección "Herencia de los cromosomas B".

Polimorfismo numérico

Los cromosomas B han sido descritos en muchas especies pero en la mayoría de los casos se han estudiado citológicamente en pocos individuos y no se han determinado frecuencias poblacionales. Consideramos que existe

polimorfismos numéricos en aquellos casos en los cuales en la población tenemos individuos sin Bs y con diferente dosis de Bs. A continuación se describirán algunas especies en las cuales se han realizado estudios poblacionales para la frecuencia de Bs.

El complemento cromosómico de *Secale cereale* (centeno) es $2n=14$ y posee entre 0 y 8Bs en muchas variedades locales que crecen naturalmente en Europa. Estudios realizados en 42 poblaciones en Corea del Sur mostró que las frecuencias de cromosomas B varían entre el 2 y 73% (Jones and Puertas, 1993).

El saltamontes *Myrmeleotettix maculatus* se encuentra en el continente europeo pero las poblaciones polimórficas para cromosomas B están en los ambientes ecológicamente favorables que corresponde a lugares cálidos y secos en el Sur de Gran Bretaña. Las poblaciones presentan individuos de 0 y 2Bs. Teniendo en cuenta las poblaciones con polimorfismo numérico para Bs, la frecuencia media de individuos con Bs es aproximadamente 40%, variando entre el 7 y 70 %. Se ha determinado que en muchas poblaciones el polimorfismo es estable porque las frecuencias de Bs han permanecido constantes durante varios años (Hewitt, 1973).

Parker et.al. (1991) estudiaron 24 poblaciones británicas de *Crepis capillaris* encontrando polimorfismo numérico para Bs en 11 de ellas. Las dosis

más frecuentes fueron 0 y 1B, siendo raros los individuos portadores de 2B. La frecuencia máxima de Bs encontrada fue 25%. Además analizaron en detalle poblaciones de Bredon Hill tomadas desde 50 hasta 300m sobre el nivel del mar, encontrando cromosomas B en 16 de las 20 poblaciones siendo del 0 - 38.2% la proporción de plantas con Bs. La distribución de las poblaciones en Bredon Hill sugieren que la altitud, o parámetros ambientales relacionados, influyen la determinación de las frecuencias de cromosomas B dado que las poblaciones de alturas menores presentan mayor frecuencia de Bs que las poblaciones que habitan a mayores alturas.

En la langosta *Trimerotropis pallidipennis*, Confalonieri (1995) analizó la frecuencia de cromosomas B en 25 poblaciones argentinas. Un cromosoma B es observado en la mayoría de los individuos machos de la población. La frecuencia de Bs varía de 0 - 0,36. Por otro lado, la frecuencia de individuos portadores de cromosomas B se encuentra asociada positivamente con la longitud y negativamente con la latitud. Este patrón de distribución indica que, los cromosomas B en las poblaciones se encuentran con mayor frecuencia en los ambientes favorables y tienden a disminuir en los ambientes marginales.

En *Zea mays* ssp. *mays* existen algunos ejemplos de polimorfismo numérico para cromosomas B en poblaciones de maíz de México, Guatemala y Estados Unidos, los cuales serán presentados en la sección "Antecedentes en el género *Zea*".

Herencia de los cromosomas B

Se ha descrito que, en general, los cromosomas B poseen mecanismos de acumulación, es decir, un sistema que incrementa o preserva el número de Bs en una población sin conferir una ventaja selectiva al individuo (Carlson, 1986).

En algunas especies vegetales ocurre inestabilidad mitótica del cromosoma B en el esporofito (raíces, coléoptile, hojas, tallo y célula madre del polen) siendo eliminado o variando en número (Jones, 1995). En éstos casos podría ocurrir un impulso mitótico, que consiste en un incremento preferencial del número de cromosomas B hacia los órganos reproductivos. Éste fenómeno ha sido descrito en *Crepis capillaris* (citado en Jones, 1995), *Aegilops speltoides* (Mendelson and Zohary, 1972) y *Sorghum stipoideum* (Wu, 1992).

El impulso puede ser en otros casos, meiótico, es decir, que los cromosomas B tienden a acumularse en los ovocitos y megasporas. En la meiosis de la célula madre de la megasporas de *Lillium callosum*, por ejemplo, los univalentes B quedan fuera de la placa metafásica y tienden a localizarse en el lado micropilar del huso con más frecuencia que en el chalazar y luego el núcleo del extremo micropilar se transforma en la ovocélula. Se postula que la migración del B hacia el polo micropilar ésta relacionado con el

hecho que en ese extremo el saco embrionario es más amplio (citado en Jones and Rees, 1982; Jones, 1991).

Además, hay casos de impulso post-meióticos, que implican no disyunción del cromosoma B en la mitosis del polen con una orientación dirigida de las 2 cromátidas B resultantes. En centeno por ejemplo, la no disyunción ocurre en la primera mitosis del grano de polen y las dos cromátidas tienden a moverse hacia el polo generativo (citado en Jones and Rees, 1982; Jones, 1991) dando luego de la segunda división mitótica, dos células espermáticas, cada una portadoras de dos cromosomas B. En la megaspora también ocurre no disyunción en la primera mitosis y las dos cromátidas resultantes se dirigen a la célula que dará posteriormente la oósfera.

En maíz (como se verá en la sección Antecedentes en el género **Zea**), la no-disyunción del cromosoma B ocurre en la segunda mitosis del grano de polen y de ésta manera se obtiene un núcleo espermático portador de 2 B y otro portador de 0B.

Existen casos en los cuales los cromosomas B no poseen mecanismos de impulso aparentes que expliquen como se generan y se mantienen los polimorfismos numéricos para Bs, como por ejemplo en **Allium schoenoprasum** (Plowman and Bougourd, 1994; Bougourd y Plowman, 1996) y **Eyprepocnemis plorans** (Lopez-Leon *et al.*, 1992; Herrera *et al.*, 1996). En

éstas especies los Bs presentan efectos fenotípicos, es decir, confieren alguna ventaja selectiva. Por lo tanto, estos Bs sin mecanismos de impulso son considerados "*adaptativos*". En cambio, los casos citados anteriormente en los cuales los Bs presentan mecanismos de impulso, tanto mitóticos como meióticos, señalan que el cromosoma B no es un cromosoma inerte sino que es "*egoísta*" y que éstos mecanismos "impulsan" la transmisión de los cromosomas B generando un polimorfismo numérico para cromosomas B.

Genotipos de transmisión

Como ya fue mencionado, los cromosomas B poseen una herencia no-Mendeliana como resultado tanto de inestabilidad mitótica o meiótica y por sus mecanismos de impulso. En muy pocas especies se estudió la herencia de los cromosomas B y se demostró la existencia de una variación para su transmisión a la progenie. Esto puede hallarse realizando cruzamientos en el cual uno de los progenitores sea portador de cromosomas B. De esta manera algunas de las progenies resultantes tienden a perderlos mientras que otras tienden a acumularlos, dando como resultado una variación para la tasa de transmisión en la población. Es interesante además, conocer si ésta variación está controlada genéticamente. A continuación se describirán algunos estudios en especies en las cuales se ha encontrado control genético para la tasa de transmisión de cromosomas B.

Myrmeleotettix maculatus (Orthoptera, Acrididae): Shaw, Hewitt y Anderson (1985) encontraron que en ésta especie hay un polimorfismo para la tasa de transmisión femenina en la mayoría de las poblaciones naturales. Se han encontrado genotipos de alta tasa de transmisión debido a un impulso meiótico que es contrarrestados por los “modificadores” del impulso meiótico que disminuyen la tasa de transmisión femenina. Por otro lado, los machos no poseen impulso y la tasa de transmisión de los cromosomas B se encuentra afectada por el ambiente. Como resultado de éstos estudios los autores sugieren que el polimorfismo de los cromosomas B en ***Myrmeleotettix maculatus*** se encuentra mantenido por un impulso meiótico neto.

Pseudococcus affinis: *P. affinis* posee un sistema cromosómico inusual (sistema lecanoide). Durante la espermatogénesis, el complemento paterno permanece heterocromático (*H*) y genéticamente inactivo, mientras que solo se forma espermatozoides a partir del complemento eucromático (*E*). Cuando los machos poseen cromosomas B, que usualmente son heterocromáticos, durante la profase I se descondensan y segregan generalmente con el set *E*, excepto en los genotipos que presentan los **TRGs** (genes que reducen la tasa de transmisión). Estos genes afectan el patrón de segregación en la meiosis de los cromosomas B. Por lo tanto, si los **TRGs** aumentan en frecuencia en la población, los cromosomas B serían eliminados. Nur y Brett (1988) sostienen que los **TRGs** se encuentran en baja frecuencia porque tienen efectos pleiotrópicos detrimentales.

Hypochoeris maculata (Compositae): Parker et al. (1982) estudiaron la herencia de los cromosomas B en ésta especie encontrando que ocurre acumulación a través de la megaspora y herencia al azar o pérdida mediante el polen. El resultado, promediando la transmisión a través de ambos progenitores, indica que no hay acumulación de los cromosomas B. Los autores realizaron cruzamientos repetidos durante 3 años en los cuales uno de los progenitores presenta cromosomas B tales como f. 1B x m. 0B y f. 0B x m. 1B, para determinar si la tasa de transmisión es un carácter estable y reproducible. Los resultados que obtuvieron señalan que la transmisión masculina está influenciada por el ambiente y la transmisión femenina está controlada genéticamente. No encontraron correlación entre la transmisión masculina y femenina del cromosoma B en la misma planta, por lo tanto, los autores sugieren que ocurre un control independiente del comportamiento de los cromosomas B por las dos vías o una sensibilidad diferencial a la influencia del ambiente.

Secale cereale (Poaceae): Centeno es la primera especie vegetal en la cual los genotipos que afectan la tasa de transmisión de los cromosomas B fueron seleccionados. Romera et al. (1991), realizaron un experimento de selección masal mediante cruzamientos f.2B x m. 0B . El carácter analizado fue: número medio de cromosomas B por planta. En la generación parental encontraron una gran variación del carácter. Entonces seleccionaron los extremos de la distribución es decir, las plantas que tienden a transmitir al B y las plantas que

tienden a perderlo. Como se obtuvo progreso selectivo este resultado indica que existen genotipos de alta y baja tasa de transmisión, demostrando así la existencia de un componente genético para la variabilidad en la tasa de transmisión de los cromosomas B.

Jiménez *et al.* (1995) estudiaron los cruzamientos recíprocos f. 0B x m. 2B (transmitidos por el progenitor masculino) encontrando que los genes que influyen la tasa de transmisión materna también lo realizan sobre la transmisión paterna. Por otro lado, la tasa de transmisión se encuentra modificada por genes que regulan la habilidad de los Bs en formar univalentes. En los individuos de la línea de alta tasa de transmisión la frecuencia de formación de bivalentes es superior a la de los individuos de baja transmisión (Jiménez *et al.*, en prensa). Este hecho determina la pérdida o conservación de los Bs durante la meiosis. Estos genes se encuentran localizados en los cromosomas B (Jiménez *et al.*, 1995). Por lo tanto, los polimorfismos para cromosomas B en centeno se encontrarían principalmente controlados por los mismos cromosomas B (Jiménez *et al.*, 1995; en prensa).

Aegilops speltoides (Poaceae): El estudio de la transmisión de los cromosomas B fue llevado a cabo en plantas portadoras de 1 y 3 cromosomas B (Cebria, Navarro and Puertas, 1994). Las plantas portadoras de 1B ,en promedio, tienden a perderlos mientras las plantas con 3B tienden a acumularlos con respecto a lo esperado según un comportamiento mendeliano

por vía materna. El número medio de Bs transmitido por vía materna presenta una gran variación en plantas con 1 y 3Bs. Realizan entonces un experimento de selección masal seleccionando aquellas plantas que mostraron tanto los mayores como los menores valores de número medio de Bs transmitido por vía materna. Luego de una generación de selección se obtiene una ganancia selectiva para alta tasa de transmisión en plantas con 1B y para baja tasa de transmisión en plantas con 3Bs. Los mismos autores estudian algunas variables del fitness y su relación con la tasa de transmisión por vía materna. No encuentran correlación entre el vigor y la tasa de transmisión de cromosomas B. Sin embargo, las plantas con 3B presentan una correlación negativa significativa entre la tasa de transmisión de Bs y la fertilidad. Por lo tanto, la selección natural podría actuar a éste nivel, balanceando la fuerzas entre el impulso y previniendo el incremento excesivo del número de Bs.

Allium schoenoprasum (Liliaceae): Bougourd y Plowman (1996) mediante cruzamientos controlados entre plantas con distinto número de Bs estudiaron la tasa de transmisión por vía materna y paterna de cromosomas B. La tasa de transmisión de Bs no difiere significativamente entre padres con distinto número de Bs tanto transmitido por vía materna como paterna. La tasa de transmisión media de B estimada a partir de todos los cruzamientos es 0,4 siendo significativamente más baja que la tasa esperada (0,5). Los resultados demuestran que en ésta especie no existe mecanismo de acumulación de los cromosomas B y además muestran una significativa pérdida durante la

transmisión a la progenie en cruzamientos controlados. En éste caso, entonces el mantenimiento de los cromosomas B dependerá de un mayor valor adaptativo de los individuos portadores de cromosomas B. En *Allium schoenoprasum* los cromosomas B confieren una ventaja selectiva, parecen acelerar la germinación y aumentar la capacidad de las semillas de germinar en ambientes extremos (Plowman and Bourgourd, 1994).

ANTECEDENTES EN EL GENERO ZEA

Tamaño del genoma

El género *Zea* es un interesante ejemplo de variación en el contenido de ADN entre especies, subespecies, poblaciones, líneas endocriadas y de libre polinización (Laurie and Bennett, 1985; Rayburn et al., 1985; Rayburn and Auger 1990a,b; Rayburn 1990; Tito, Poggio and Naranjo, 1991). En maíz se describió un amplio rango (ca.38 %) en el contenido de ADN en poblaciones y variedades de Estados Unidos y México (Laurie and Bennett, 1985; Rayburn et al., 1985). Diferencias en el contenido de heterocromatina y/o presencia de cromosomas B están involucrados en la variación del tamaño del genoma del género (Laurie and Bennett, 1985; Rayburn et al., 1985; Porter and Rayburn, 1990; Tito, Poggio and Naranjo, 1991).

Tamaño del genoma - Altitud

Rayburn y Auger (1990a) analizaron la relación entre el tamaño del genoma y la altitud en 4 poblaciones pertenecientes a razas indígenas de México adaptadas a diferentes alturas de cultivo (30 y 2652 m). hallando que el contenido de ADN está correlacionado negativamente con la altura. Rayburn (1990) analizando 12 poblaciones de Arizona cultivadas entre los 1510 y 2135m describe también una correlación negativa entre éstas variables. Sin embargo,

Rayburn y Auger (1990b) estudiando 12 poblaciones de Arizona cultivadas entre los 30 y 1600m, en el mismo material estudiado posteriormente por Porter y Rayburn (1990) hallaron una correlación positiva entre el tamaño del genoma y la altitud.

Relación entre el tamaño del genoma, heterocromatina, cromosomas B y Altitud

En maíz las bandas C heterocromáticas son equivalentes a los nudos (*knobs*) paquiténicos (Hadlaczky y Kálmán, 1975; Ward, 1980; Mastenbroek y De Wet, 1983; Aguiar-Perecin y Vosa, 1985). El número de nudos paquiténicos (*knobs*) varía entre plantas y también entre poblaciones y por lo tanto han sido utilizados para dilucidar relaciones entre las razas de maíz (Longley, 1938; Longley and Kato-Y, 1965; McClintock, Kato and Blumenschein, 1981).

Muchos estudios sobre la distribución y frecuencia de nudos paquiténicos (*knobs*), bandas C y cromosomas B en muchos organismos y también en maíz, han mostrado que están estrechamente relacionados con variables ambientales (Jones, 1995; Bennett and Leitch, 1995).

Bretting y Goodman (1989) analizaron los datos de McClintock, Kato y Blumenschein (1981) y encontraron una correlación negativa entre la presencia de cromosomas B y la altitud. Sin embargo éste análisis se basa en sólo dos

plantas en algunas poblaciones (McClintock , Kato and Blumenschein 1981, Cuadros 8, 10 and 12).

Porter y Rayburn (1990) encontraron que el número de B no está significativamente correlacionado con la altitud, número de bandas C, o contenido de ADN nuclear en 12 poblaciones indígenas de Arizona

Longley (1938) analizó la asociación entre el número de nudos paquiténicos (*knobs*) y la presencia de cromosomas B en poblaciones indígenas de Norteamérica y encontró una correlación negativa entre dichas variables es decir, que los cromosomas B eran más frecuentes en las poblaciones con un número menor o igual a siete nudos paquiténicos (*knobs*). Otros autores encontraron similares resultados (Bianchi, Ghatnekar and Ghidoni, 1963).

Mangelsdorf y Cameron (1942) observaron una correlación negativa entre el número de *knobs* y la altitud en razas de maíz de Guatemala; Longley y Kato (1965) y Bennett (1976, re-evaluando los datos de Wellhausen et al., 1952) observaron una correlación similar en otras razas latinoamericanas. Rayburn et al. (1985) encontraron una relación similar cuando analizaron las bandas C en líneas de maíz adaptadas a varias latitudes y también hallaron una correlación positiva entre el contenido de ADN y número de nudos paquiténicos (*knobs*) y una correlación negativa entre el contenido de ADN y la altitud. Por otro lado, Porter y Rayburn (1990) estudiaron el número de bandas C y

encontraron que las mismas están correlacionadas positivamente con la altitud y el contenido de ADN.

Estos trabajos señalan que los resultados obtenidos relacionando el tamaño del genoma, bandas C (equivalentes a los *knobs*), cromosomas B y altitud de cultivo en poblaciones de maíz de México y Estados Unidos son, en algunos casos, contradictorios. El motivo sería en parte que algunos de estos estudios fueron realizados analizando pocos individuos.

La relación entre el contenido de ADN y el porcentaje de heterocromatina ha sido también analizada en poblaciones de maíz de Estados Unidos por Rayburn et al. (1985) y en el género *Zea* por Tito, Poggio y Naranjo (1991). En ambos estudios se encontró una asociación positiva entre el contenido de ADN y las bandas C pero los segundos autores mencionados consideran que la asociación es con el tamaño de las bandas (porcentaje de heterocromatina) más que con el número de bandas C presentes.

Heterocromatina: nudos paquiténicos (*knobs*) - banda C

Como se ha mencionado anteriormente la heterocromatina se visualiza en paquitene como un nudo (*knob*). Haldlaczky y Kálmán (1975) realizan el primer estudio de identificación de los cromosomas mitóticos de maíz mediante la técnica de bandeo C. Estos autores concluyen que el análisis permite discriminar a los cromosomas homólogos pertenecientes a tres líneas

endocriadas y a sus híbridos y además que las bandas heterocromáticas observadas corresponden a los nudos paquiténicos. Ward (1980) considera que los autores anteriores discuten una correspondencia entre los nudos paquiténicos (*knobs*) y bandas C sin un real conocimiento de la posición de los nudos (*knobs*) en los cromosomas. Ward (1980) realiza mediciones de las posiciones de los nudos paquiténicos (*knobs*) y de las bandas C de los cromosomas mitóticos y considera que no coinciden debido aparentemente a diferencias en la contracción de los cromosomas en la mitosis y meiosis pero que las regiones teñidas diferencialmente en los cromosomas mitóticos son los nudos (*knobs*) vistos en meiosis. Por otro lado, Ward (1980) analizó mediante la técnica de bandeado C el cromosoma 10, que posee un gran bloque heterocromático en posición distal (denominado K10), y el cromosoma B, encontrando que el nudo (*knob*) del K10 y sólo la heterocromatina céntrica del cromosoma B se tiñen. Estos resultados indican que la heterocromatina de los nudos (*knobs*), del K10 y la heterocromatina céntrica del cromosoma B poseen una composición similar. Posteriormente Peacock et al.(1981) aislaron una secuencia de ADN altamente repetido del genoma de maíz encontrando que, la unidad repetida aislada y secuenciada posee 185 pb. Mediante hibridación in situ demuestran que ésta secuencia de ADN altamente repetida está localizada en la heterocromatina de los nudos (*knobs*), del K10 y en el nudo (*knob*) proximal del cromosoma B pero no se encuentra en la heterocromatina centromérica, de la región organizadora del nucleolo (NOR), ni en el bloque distal del brazo largo del cromosoma B. Este último resultado junto al obtenido

por Ward (1980) demuestran que existen distintas clases de heterocromatina en maíz.

Mediante modificaciones de la técnica de bandeado C utilizada en los trabajos anteriores otros autores pudieron observar las bandas heterocromáticas centroméricas (Chow y Larter, 1981) y las bandas correspondiente a la región organizadora del nucleolo (NOR) (Gu et al., 1985).

Polimorfismo numérico para cromosomas B

Los cromosomas B están ampliamente distribuidos en maíz y su presencia ha sido determinada en muchas poblaciones, pero sin embargo, son escasos los estudios poblacionales y en algunos casos el tamaño muestral analizado es reducido. Longley (1938) analizó la frecuencia de cromosomas B en 431 plantas de las cuales 66 portaban cromosomas B (15.31%) en poblaciones indígenas de Estados Unidos. Longley y Kato-Y (1965) estudiaron 1023 plantas y solo encontró 95 plantas con cromosomas B (9.3%) en razas latinoamericanas. Kato (1976) encontró que sólo 46 de las 94 poblaciones pertenecientes a 9 razas mexicanas de maíz presentan un polimorfismo numérico para Bs encontrando 86 plantas con Bs en 531 plantas analizadas (16.2%).

Herencia de los cromosomas B en maíz

En maíz, Román (1947) determinó por medio de translocaciones entre el cromosoma B y cromosomas normales del complemento, que la no disyunción del cromosoma B ocurre en la segunda mitosis del grano de polen produciéndose una célula espermática con 0B y otra con 2B. En 1948, utilizando el mismo método, analiza el resultado de cruzamientos entre plantas de 0B y 1B y deduce que las células espermáticas portadoras de los 2 cromosomas B resultantes de la no-disyunción en la segunda mitosis del polen, fertilizan preferencialmente a la oófera mientras que la célula que no porta Bs fertiliza al núcleo secundario que dará el endosperma. Roman (1948) sugiere que la fertilización preferencial (dirigida) junto a la no-disyunción servirían como mecanismos de acumulación de los cromosomas B permitiéndole incrementar así su número en la población.

Carlson y Tau San Chou (1981) analizan las regiones en el cromosoma B que controlan su no-disyunción, las mismas han sido identificadas previamente por varios autores. El cromosomas B comprende 4 regiones: 1 (eucromática en posición distal del cromosoma B), 2 (eucromatina proximal), 3 (heterocromatina centromérica del brazo largo) y 4 (heterocromatina proximal del brazo corto). La región 1 y 2 son esenciales y tienen función en *trans* en la no-disyunción. La región 3 actúa en *cis* como receptor de la no-disyunción, es el lugar primario

donde las cromátidas no se dividen. La región 4 posee función regulatoria en *trans* sobre la no-disyunción, es decir, afecta la tasa de no-disyunción.

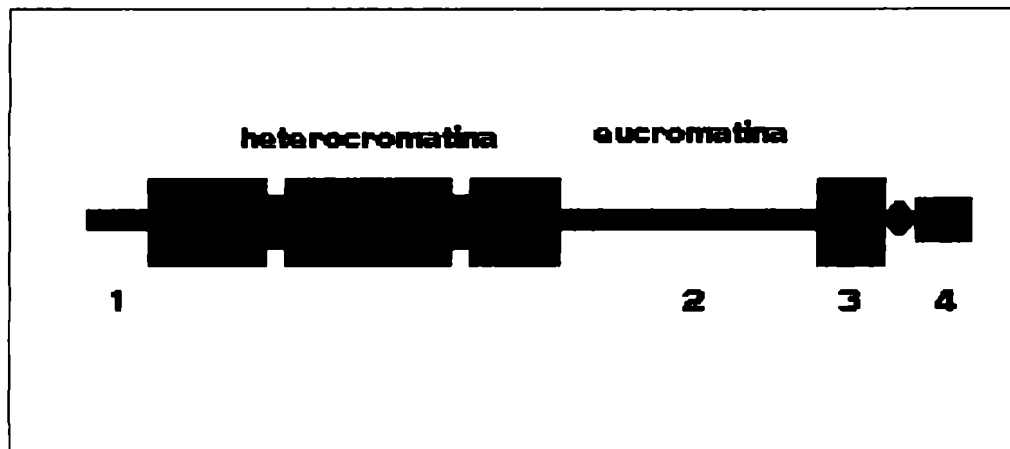


Figura 1. Morfología del cromosomas B en paquitene según Carlson and Tau San-Chou (1981)

Carlson y Roseman (1992) mediante translocaciones entre el cromosoma B y el cromosoma 9 en maíz, estudiaron la presencia de un mecanismo que estabiliza al univalente del cromosoma tipo-B (B-9) y le permite migrar a un polo en meiosis, a pesar de no aparear con el cromosoma 9. Este hallazgo es la primera evidencia de la existencia de control genético de la pérdida meiótica de los Bs. La supresión de la pérdida meiótica estaría controlada por lo menos por las regiones proximales y distales del cromosoma B. Los autores consideran que éste mecanismo debe existir en los cromosomas B de otras especies ya que en algunos casos hay una migración regular del univalente en la meiosis y son luego integrados en los núcleos telofásicos.

OBJETIVOS

1) Se han realizado muchos estudios sobre el tamaño del genoma en poblaciones de maíz de México y Estados Unidos, en los mismos se ha encontrado una variación ca. 38%. La variación hallada en estas poblaciones se debe a diferencias en el porcentaje de heterocromatina y ,en algunos casos, a la presencia de cromosomas B. En Argentina existen poblaciones indígenas de maíz, que no habían sido estudiadas citogenéticamente. Estas poblaciones adaptadas a diferentes alturas de cultivo (que corresponden a diferentes zonas geográficas). Las razas nativas constituyen una fuente de complejos génicos adaptativos muy importantes y su estudio es necesario tanto para diseñar los enfoque genéticos para su preservación como para compensar la reducida variabilidad genética que poseen las líneas mejoradas. Además constituyen un modelo interesante para analizar el tamaño del genoma, polimorfismo numérico para Bs, porcentaje de heterocromatina en relación a parámetros geográficos y poder aportar conocimiento a los siguientes interrogantes:

- ♦ Existe variación del contenido de ADN en las poblaciones argentinas?, La misma se debe a diferencias en el porcentaje de heterocromatina o a la presencia de cromosomas B? Que relación existe entre éstas dos entidades heterocromáticas?

- ♦ En muchos cultivos se ha descrito la existencia de clines ADN-Altitud que se deberían a selección impuesta por el hombre (Bennett, 1987), dado que las poblaciones argentinas se distribuyen desde 80-3600 m, es interesante conocer si existe un cline en el tamaño del genoma. Existe en las poblaciones argentinas, relación entre el tamaño del genoma, las frecuencias de individuos con cromosomas B y la altura de cultivo?

- ♦ Desde las primeras investigaciones citogenéticas realizadas en maíz se ha estudiado los nudos paquiténicos (*knobs*) y debido a esto se conocen sus posiciones, composición y son considerados importantes para establecer relaciones entre las razas de maíz (McClintock, Kato and Blumeschein, 1981; Longley, 1938). Se ha encontrado, además relación entre ellos y el tamaño del genoma, número de cromosomas B y altitud en poblaciones indígenas de maíz del norte y de mesoamerica (Bretting and Goodman, 1989). El conocimiento sobre las poblaciones sudamericanas es escaso y aún más en las de Argentina. En el trabajo realizado por McClintock, Kato y Blumeschein (1981) la muestra de poblaciones de maíz de Argentina fue escasa y con muy pocos individuos analizados. Es interesante entonces, conocer el número y posición de los nudos paquiténicos (*knobs*) o su equivalente, las bandas C, y así estudiar algunas de las relaciones mencionadas anteriormente en las poblaciones indígenas argentinas.

2) Con respecto a los cromosomas B la mayor parte del conocimiento se refiere a sus mecanismos de acumulación (Carlson 1986; Carlson y Roseman 1992) pero no hay estudios que analicen su comportamiento en una población. Los mecanismos de acumulación conocidos para los cromosomas B de maíz son a través de la transmisión paterna, y por lo tanto, resulta interesante conocer la transmisión femenina en maíz, es decir, analizar si todos los individuos de una población transmiten con la misma frecuencia al cromosoma B por vía materna. El hallazgo de variación para la tasa de transmisión femenina de los cromosomas B sugiere que la misma puede estar controlada genéticamente y mediante la realización de un experimento de selección se puede confirmar dicha hipótesis. Conocer si la tasa de transmisión de los cromosomas B se encuentra bajo control genético nos permitirá postular hipótesis sobre la dinámica poblacional de los cromosomas B de maíz.

MATERIALES

Las poblaciones nativas de maíz de Argentina fueron coleccionadas directamente en los lugares de cultivo y posteriormente conservadas en el Laboratorio de Recursos Genéticos Vegetales "N.I. Vavilov", (FA, UBA) y en el Instituto Fitotécnico de Santa Catalina (FCAyF, UNLP) - CIGEN (UNLP-CONICET).

El Ing. Julián Cámara Hernández (F.A., UBA), realizó la determinación del material coleccionado y estudiado.

En la tabla 1 se indica el nombre de la raza, las distintas poblaciones analizadas, su procedencia y el nombre de la persona que realizó la colección del material.

Las abreviaturas de quienes coleccionaron son: J.C.H.= Julián Cámara Hernández, C.A.N = Carlos A. Naranjo, A.M.C = Amílcar Mauricio Chiavarino, M.R. = Marcela Rosato.

| RAZA | POBLACION | PROCEDENCIA (Localidad, Departamento, Provincia, altitud (m.s.m)) | COLECCION |
|----------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Amarillo chico | VAV 6451 | El Condado, Santa Victoria, Salta, 2000 m. | J C H |
| | VAV 6476 | Termas de Reyes, Capital, Jujuy, 1690 m. | C A N y A M C |
| | VAV 6484 | Tumbaya, Tumbaya, Jujuy, 2010 m. | C A N y A M C |
| Capia blanco | VAV 6418 | Acoyte, Santa Victoria, Salta, 2600 m. | J C H |
| Capia rosado | VAV 6162 | Rodeo Pampa, Sta. Victoria, Salta, 2900 m. | J C H |
| Altiplano | VAV 6167 | El Puesto, Santa Victoria, Salta, 3000 m. | J C H |
| | VAV 6473 | Susques, Susques, Jujuy, 3620 m. | C A N y A M C |
| | VAV 6474 | Mal Paso, Susques, Jujuy, 3520 m. | C A N y A M C |
| Pisingallo | VAV 6416 | Acoyte, Santa Victoria, Salta, 2600 m. | J C H |
| | VAV 6313 | Los Tordillos, Piedras Blancas, Ambato, Catamarca, 1600 m. | J C H, C A N, A M C y M R |
| Chiriguano | VAV 6218 | El Condado, Santa Victoria, Salta, 2000 m. | J C H |
| Amarillo grande | VAV 6480 | Purmamarca, Tumbaya, Jujuy, 2420 m. | C A N y A M C |
| Harinoso | VAV 6475 | Iruya, Iruya, Salta, 3400 m. | C A N y A M C |
| Blanco y Ocho rayas | VAV 6481 | Metán Viejo, Metán, Salta, 750 m. | C A N y A M C |
| | VAV 6483 | Las Arcas, Trancas, Tucumán, 1250m | C.A.N. y A.M.C. |
| Orgullo cuarentón | VAV 6482 | La Candelaria, Candelaria, Salta, 910 m. | C A N y A M C |
| Blanco | VAV 6479 | Purmamarca, Tumbaya, Jujuy, 2180 m. | C A N y A M C |
| | VAV 6485 | Colonia San José, Tilcara, Jujuy, 2670 m. | C A N y A M C |
| Colorado | VAV 6169 | Frontera, Pilcomayo, Formosa, 90 m. | J C H |
| | VAV 6223 | Misión Tacaaglé, Pilagás, Formosa, 90 m. | J C H |
| Pichinga | VAV 6170 | Villa Dos Trece, Pirané, Formosa, 90 m. | J C H |

Tabla 1

METODOLOGÍA

A. Análisis del complemento mitótico

Todos los estudios fueron realizados en ápices de raíces de granos en germinación.

1. En cajas de petri se disponen los individuos sobre un disco húmedo de papel de filtro, aproximadamente a los 3 días comienza la germinación.
2. Las raíces son cortadas aproximadamente a 1cm de longitud y pretratadas en 0.02 M 8-hidroxiquinoleína durante 3 horas.
3. Las raíces son fijadas en 3:1 (alcohol absoluto:ácido acético glacial).
4. La coloración es realizada con hematoxilina propiónica y citrato férrico como mordiente (Nuñez, 1968), previa hidrólisis con HCL 5N durante 10 minutos.

B. Determinación del contenido de DNA

B.1) Técnica de Tinción y medición

El contenido de DNA es medido en núcleos anafásico-telofásicos (2C) de ápices de raíces fijadas en 3:1 (alcohol absoluto: ácido acético glacial).

Se utilizó la técnica descrita en Poggio y Hunziker (1986), adaptada a maíz por Tito et al. (1991), en donde se describe la realización de la curva de calibración del tiempo de hidrólisis óptimo para maíz.

La técnica utilizada es la siguiente:

1. Se realizan tres lavados de los ápices en agua destilada de 10 minutos cada uno.
2. Hidrólisis en ClH 5N a 20⁰ C durante 30 minutos.
3. Tres lavados en agua destilada de 15 minutos cada uno.
4. La coloración se realiza con el reactivo de Schiff a pH 2.2 durante 120 minutos en oscuridad.
5. Tres lavados en agua sulfurosa de 10 minutos cada uno.
6. Los ápices son conservados en agua destilada hasta ser utilizados.
7. Se realiza el aplasto en ácido acético 45% .
8. Se congelan los preparados en CO₂ , luego se despegan los cubreobjetos y se deshidratan en un koplín con alcohol absoluto.
9. Se montan en Euparal y son conservados en oscuridad.

El contenido de DNA por núcleo expresado en unidades arbitrarias (U.A.) es medido a una longitud de onda de 570 nm utilizando el método de barrido en un microespectrofotómetro Universal Zeiss (UMS 30).

El contenido de DNA es expresado en pg (10^{-12} gr) utilizando como testigo en cada una de las mediciones efectuadas, la línea C-tester que fue calibrada por Tito *et al.* (1991) y posee $2C = 5.78$ pg, ésta línea dejó de ser utilizada debido a que presenta muchos años de endocria y las plantas son débiles y difíciles de mantener.

B.2) Calibración del testigo opaco-2

La línea *opaco-2* reúne las características resumidas por Bennett y Smith (1976) con respecto a la elección de un testigo. Se realizó la calibración de ésta línea obteniéndose un valor del contenido de DNA $2C = 6,658 \pm 0,035$ pg, la línea fue legada por la Lic. Mónica Aulicino y es cultivada en el Instituto Fitotécnico de Santa Catalina.

C. Técnicas de bandeo cromosómico

1. Bando C

La técnica de Bando C utilizada es la descrita por Schwarzacher et al. (1980) y adaptada a maíz. Su procedimiento es el siguiente:

1. Los ápices de raíces pretratadas y fijadas, son lavadas en buffer citrato (0.01 M ácido cítrico- citrato de sodio, pH 4.5 -4.8) durante 30 minutos.
2. Se incuban en una solución de enzimas celulasa-pectinasa, durante aproximadamente 90 minutos a 37°C , luego son transferidas nuevamente al buffer citrato hasta realizar el aplasto.
3. Se realiza el aplasto en acético 45% .
4. Los preparados se congelan en CO_2 , se despega el cubreobjeto, se deshidrata en alcohol absoluto y se mantienen en alcohol absoluto entre 24-48 hs.
5. Se realiza una hidrólisis en CIH 0.2N a 60°C durante 3 minutos y luego los preparados se lavan en agua corriente.
6. Se colocan los portaobjetos en un Koplín conteniendo una solución saturada de hidróxido de bario a temperatura ambiente durante 10 minutos.

7. Posteriormente los preparados son lavados enérgicamente en agua corriente, luego en agua destilada y transferidos a 2 x SSC a 60 °C durante 60 minutos.
8. Se realiza la tinción en Giemsa 5% en buffer fosfato pH= 7, controlando el tiempo de coloración en el microscopio.
9. Lograda la coloración óptima los preparados son lavados en agua corriente y luego secados con aire caliente.
10. Finalmente se sumergen en un koplín con xilol y se montan en DPX.

2. Bando fluorescente

La técnica de bando fluorescente utilizando DAPI y Cromomicina (CMA) es la descrita por Schweizer (1976) con modificaciones.

1. Se incuban los ápices en buffer citrato (0,01M) y posteriormente se realiza la digestión con la solución de pectinasa - celulasa (descrita anteriormente).
2. Se realiza el aplasto en acético 45%.
3. Los preparados se congelan en CO₂, se despegan el cubreobjeto y se dejan envejecer unos días.
4. Los preparados son lavados en Buffer McIlvaine's (0,1M ác. cítrico - 0,2 M PO₄HNa₂, pH 7) y teñidos con DAPI durante 20 minutos.
5. Se lavan alternando agua destilada y Buffer McIlvaine's (pH 7).
6. Se realiza posteriormente la tinción con CMA durante 60 minutos.

7. Se lavan alternando agua destilada y Buffer McIlvaine's (pH 7).
8. Se tiñe con el antibiótico Distamicina A (DA) durante 20 minutos y posteriormente se lavan con agua destilada.
9. Se realiza el montaje en Glicerina : Buffer McIlvaine (1:1) + 0.25 umoles de $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.
10. Los preparados son incubados a 37°C durante tres días antes de ser observados.

Para observar los preparados se utiliza un Microscopio de Epifluorescencia Carl Zeiss con los siguientes filtros: CMA 487901 (UV- H365) (nro. 06) y DAPI 487906 (Blue Violet H 436) (nro. 01 ó 09).

Las microfotografías fueron tomadas con película T - MAX 400 Kodak (blanco y negro) y Ektapress pluss-400 (Kodak).

D Experimento para analizar el contenido de ADN y Polimorfismo numérico para cromosomas B

Para realizar el estudio del contenido de ADN, Polimorfismo numérico para cromosomas B, se procedió en primer lugar a analizar la frecuencia de cromosomas B en al menos 30 individuos por población (mediante el método descrito en Análisis del complemento cromosómico). En primer lugar se identificaron los individuos antes de la excisión de las raíces, de las cuales una

será fijada para determinar el contenido de ADN y otras raíces del mismo individuo serán pretratadas y posteriormente fijadas para determinar el número cromosómico. En aquellos individuos no portadores de cromosomas B, es decir con el complemento cromosómico regular ($2n=20$), se realizan los preparados para determinar el contenido de ADN en al menos 4 individuos por población en cada una de las 17 poblaciones analizadas.

La realización de los preparados mediante la tinción con Feulgen fueron realizados con el máximo control posible en todos los pasos, como la condición estable de temperatura durante la hidrólisis (20C), utilización del mismo reactivo de Schiff en todo el experimento. Siempre se realizaron conjuntamente los preparados de al menos 2 poblaciones y la línea testigo *opaco-2*. Las mediciones del contenido de ADN son realizadas en 20 núcleos anafase-telofase (2C) en cada individuo de la población y en 20 núcleos de cada individuo de la línea testigo *opaco-2*.

E Experimento para analizar la relación entre la dosis de Bs y el contenido de ADN

El experimento de medición del contenido de ADN en individuos portadores de diferente dosis de Bs se realiza en 4 poblaciones con alta frecuencia media de cromosomas B. Este experimento es llevado a cabo luego

del análisis del polimorfismo numérico (como fue explicado anteriormente) y previa identificación de los individuos con las diferentes dosis de Bs (0B, 1B, 2B, 3B y 4B). Los preparados de dichos individuos se realizaron durante dos días consecutivos, aleatorizando las poblaciones y la dosis (se realizaron 40 preparados en cada día). Las mediciones fueron realizadas en 20 núcleos telofásicos (2C) por individuo y en al menos 3 individuos por cada dosis en cada una de las 4 poblaciones estudiadas. Además, se midieron al menos dos individuos de la línea *opaco-2* (por día de medición) y al menos 15 núcleos por individuo).

F. Análisis de la tasa de transmisión femenina del cromosoma B

F.1. Realización de cruzamientos f. 1B x m. 0B

En la Figura 3 se representa el esquema de cruzamientos realizados para obtener cada generación y analizar la tasa de transmisión por vía materna del cromosoma B. A continuación se describe los pasos necesarios para realizar los cruzamientos.

1. Los granos (individuos).se ponen a germinar en cajas de petri sobre discos humedecidos de papel de filtro.

2. Se determina en el ápice de raíz el número de cromosomas B portado por los individuos (de la manera descrita en Análisis del complemento mitótico).
3. Las plántulas previamente identificadas son transplantadas en el campo experimental del Instituto Fitotécnico de Santa Catalina.
4. En la época de prefloración (luego de 55 días, aproximadamente) se controla diariamente la aparición de los estigmas en las espigas (inflorescencia femenina) de plantas portadoras de un cromosoma B y se coloca un sobre de papel para evitar la libre polinización.
5. Durante la antesis, en las panojas (inflorescencia masculina) de plantas sin cromosomas B se coloca un sobre para coleccionar el polen.
6. Se deposita el polen sobre los estigmas receptivos y se tapa nuevamente el cruzamiento y se identifica (Figura 2).
7. Se cosecha la espiga madura a los 50 días aproximadamente.
8. Las espigas son secadas al sol durante 15 días y son conservadas en sobres dentro de recipientes conteniendo sílica gel a 5⁰C.

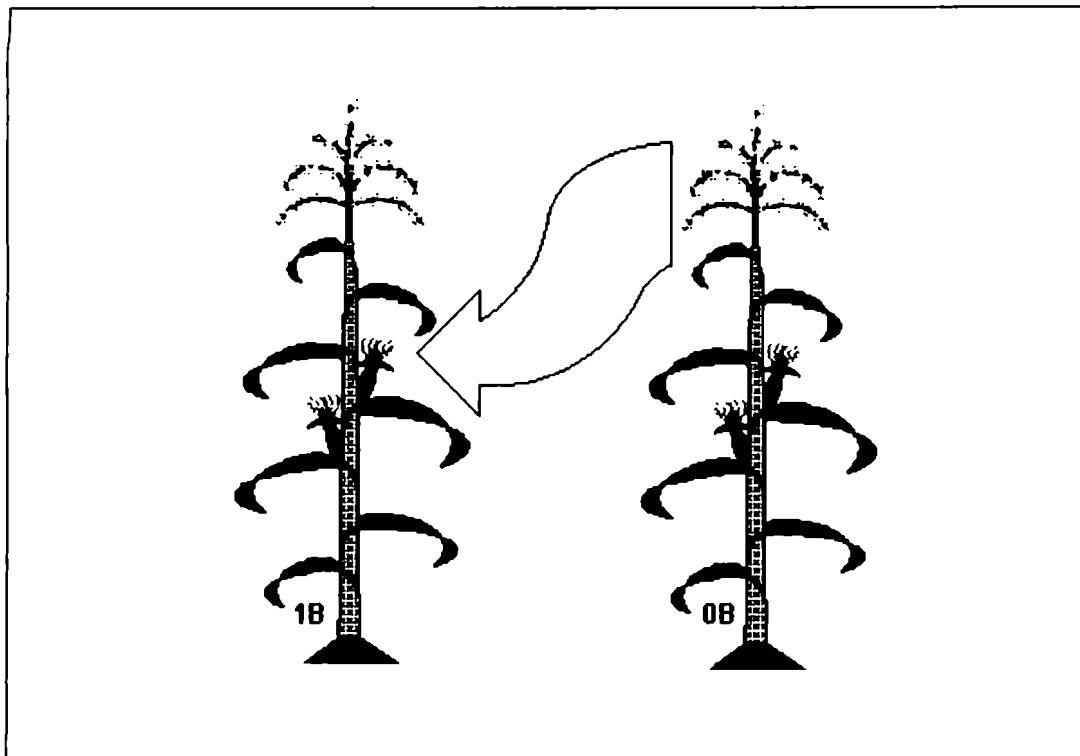


Figura 2. Esquema de los cruzamientos 1Bx0B realizados.

F.2. Experimento de selección mediante cruzamientos controlados

El experimento consiste en realizar cruzamientos usando como progenitor femenino plantas portadoras de un cromosomas B, por lo tanto los cruzamientos son f. 1B x m. 0B. Se realizaron 20 cruzamientos, la progenie resultante de los cruzamientos realizados se denominó Generación parental (**G0**) (Figura 3). El carácter a analizar es la tasa de transmisión de los cromosomas B (Tt_B) que es el cociente entre el número medio de Bs transmitido a la progenie y el número de Bs del progenitor (Shaw and Hewitt, 1985). La progenie resultante de cruzamientos f. 1B x m. 0B presenta 0B ó 1B.

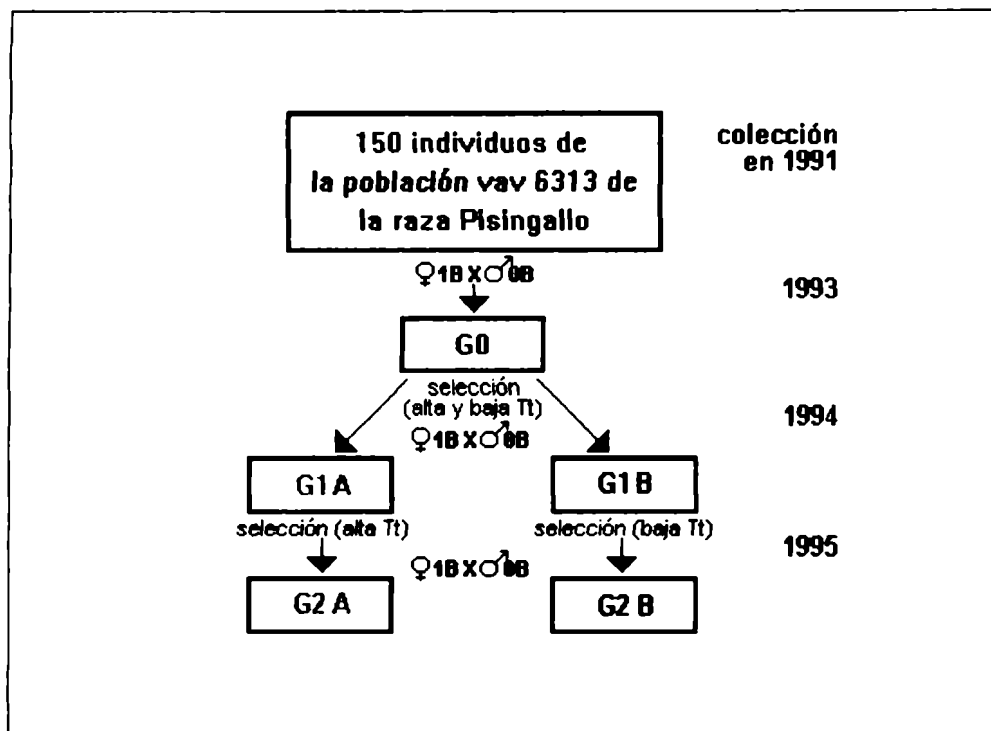


Figura 3. Esquema de los cruzamientos realizados.

La tasa de transmisión femenina del cromosoma B (Ttf_B) en la G0 y en cada generación seleccionada (G1 y G2), se calcula en las progenies resultantes de los cruzamientos realizando el recuento cromosómico en por lo menos 25 individuos (granos) por cada espiga (de la manera descrita en Análisis del complemento cromosómico). En la G0 se estudiaron 20 cruzamientos, en la G1 24 cruzamientos y en la G2 17 cruzamientos.

Se seleccionaron las progenies de la G0 que mostraron las más bajas y las más altas Ttf_B , y con éstas se realizaron cruzamientos f. 1B x m. 0B. La progenie resultante se denominó G1 (Figura 3), siendo G1b y G1a las progenies seleccionadas para baja y alta tasa de transmisión del cromosoma B,

respectivamente. Al igual que en la **G0** se calcula la T_{f_B} . Mediante un análisis de la varianza se comparan las tasas de transmisión media de la **G0 vs G1b**, **G0 vs G1a** y **G1b vs G1a**

Se realiza nuevamente una selección de los individuos que presentaron la menor y la mayor tasa transmisión de la **G1b** y **G1a**, respectivamente. Se hicieron cruzamientos f. 1B x m. 0B, la progenie obtenida de estos cruzamientos se denominó **G2b** y **G2a** (Figura 3).

Se calculó la T_{f_B} en 9 progenies pertenecientes a la **G2b** y 8 de la **G2a**. A través de un análisis de la varianza, se compararon las tasa de transmisión media femenina del cromosoma B de **G1b vs G2b**; **G1a vs G2a** y **G2b vs G2a**.

El experimento es sobredimensionado al realizar la siembra para disponer de un número de plantas óptimo que sobrevivan a los factores ambientales adversos, depredación, coincidencia de la receptividad de los estigmas (de plantas con 1B) con la madurez del polen (de plantas con 0B) éxito en el cruzamiento, etc.

Nota 1: A los valores de las tasa de transmisión obtenidas en **G0**, **G1** y **G2**, mediante el recuento cromosómico de la progenie, se agregan los recuentos realizados en los individuos que serán empleados como progenitores seleccionados para la siguiente generación.

Nota 2: Las tasas de transmisión de cromosomas B en muchos de los cruzamientos seleccionados no coinciden con los valores más extremos de cada generación, porque: 1) Las espigas que presentaron los mayores o menores valores de tasa de transmisión, luego de su determinación, muchas veces resultaron con insuficiente cantidad de granos como para iniciar la siguiente generación. 2) Las tasas de transmisión de las espigas seleccionadas en algunos casos sufrieron pequeños cambios respecto del valor seleccionado, luego del agregado de los datos de las determinaciones del número de Bs de los individuos tomados para la siguiente generación.

G. Analisis Estadísticos

Se evaluó la asociación entre las variables: frecuencia de cromosomas B vs altura de cultivo, contenido de ADN medio vs altura de cultivo, frecuencia de cromosomas B vs contenido de ADN medio, número medio de bandas DAPI+ vs contenido de ADN, número medio de bandas DAPI+ vs frecuencia de cromosomas B, y número medio de bandas DAPI+ vs altura de cultivo mediante un análisis de correlación simple.

El contenido de ADN determinado en diferentes dosis de cromosomas B (0, 1, 2, 3) fue evaluado estadísticamente utilizando un Análisis de la Varianza de dos factores (factor A: dosis de cromosomas B, factor B: contenido de ADN).

Las tasas de transmisión media de cromosomas B por vía materna en las generaciones: **G0**, **G1b**, **G1a**, **G2b** y **G2a**, fueron evaluadas estadísticamente mediante un Análisis de la Varianza. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa Statgraph.

RESULTADOS

POLIMORFISMO NUMÉRICO PARA CROMOSOMAS B

Se estudió el polimorfismo numérico para cromosomas B en 21 poblaciones nativas de maíz (1120 individuos, pertenecientes a 13 razas), cultivadas a diferentes alturas (80 - 3620 m) provenientes del N. Argentino (Tabla 2, Figura 4). En 19 poblaciones se halló un polimorfismo numérico para cromosomas B, la variación de la frecuencia de individuos con Bs es muy amplia (0 - 94%). El número de Bs presentes en los individuos varía entre 0, 1 y 8Bs, siendo 0, 1, 2 y 3 las dosis más frecuentes (Fig. 4). Las poblaciones cultivadas entre 1600 - 3240 m presentan por lo general, las mayores frecuencias de individuos portadores de Bs (20 - 94%), mientras que las cultivadas a alturas menores a 1600 m tienen las menores frecuencias (2 - 26%) (Tabla 2).

Morfológicamente los cromosomas B son similares en todas las poblaciones estudiadas. Los cromosomas B son telocéntricos y son los más pequeños del complemento por lo tanto se distinguen sin dificultad en las metafases mitóticas. Cada cromosoma B representa aproximadamente un 4% del volumen cromosómico total (Figura 5).

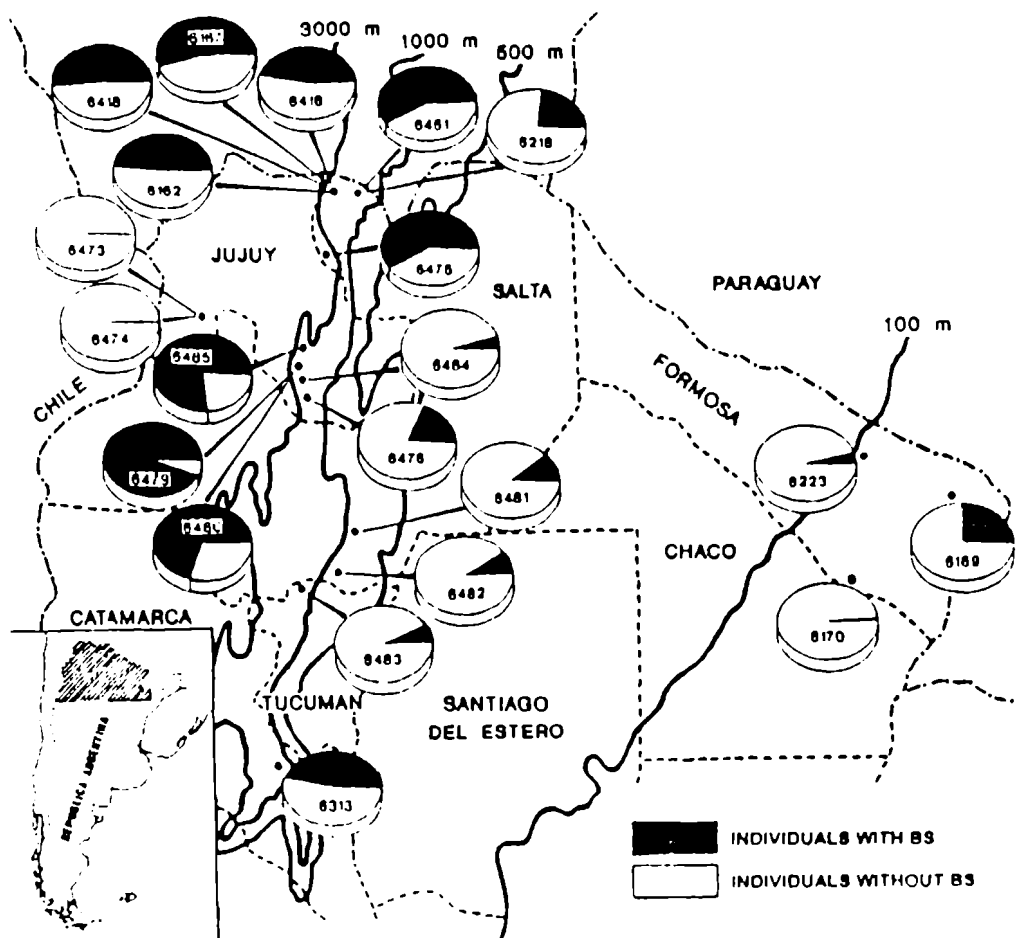


FIGURA 4. Distribucion del material estudiado del Norte Argentino. La frecuencia de plantas con Bs esta representado por el area del sector negro.



FIGURA 5. Cromosomas mitóticos. a) $2n=20$. b) $2n=20+1B$. c) $2n=20+3B$.

| Raza | Población | Altura (m) | Número de individuos con diferente dosis de Bs (0-8Bs) | | | | | | | | | | Frec. de Plantas con Bs (%) | Nro. medio de Bs por planta |
|----------------------------|-----------|---------------|-----------------------------------------------------------|------------|------------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|-------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| | | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | total | | |
| <i>Blanco</i> | VAV 6479 | 2180 | 3 | 13 | 9 | 14 | 6 | 5 | 1 | | 1 | 52 | 94,2 | 2,615 |
| <i>Blanco</i> | VAV 6485 | 2670 | 10 | 10 | 11 | 9 | 2 | 1 | | | 1 | 44 | 77,3 | 1,795 |
| <i>Amarillo grande</i> | VAV 6480 | 2420 | 15 | 12 | 13 | 7 | 2 | 2 | 1 | | | 52 | 71,2 | 1,596 |
| <i>Altiplano</i> | VAV 6167 | 3000 | 15 | 4 | 9 | 2 | 4 | | | | | 34 | 55,9 | 1,294 |
| <i>Harinoso</i> | VAV 6475 | 3240 | 20 | 15 | 8 | 4 | 3 | | | | | 50 | 60,0 | 1,100 |
| <i>Capla blanco</i> | VAV 6418 | 2600 | 24 | 8 | 11 | 1 | 4 | | | | | 48 | 50,0 | 1,020 |
| <i>Pisingallo</i> | VAV 6416 | 2600 | 20 | 13 | 3 | 2 | 2 | 1 | | | | 41 | 51,2 | 0,927 |
| <i>Amarillo chico</i> | VAV 6451 | 2000 | 45 | 44 | 9 | 11 | 1 | | | | | 110 | 59,1 | 0,900 |
| <i>Capla rosado</i> | VAV 6162 | 2900 | 19 | 14 | 3 | | | | | | 1 | 37 | 48,6 | 0,730 |
| <i>Pisingallo</i> | VAV 6313 | 1600 | 100 | 59 | 10 | 13 | 2 | | | | | 184 | 45,6 | 0,685 |
| <i>Colorado</i> | VAV 6169 | 80 | 25 | 7 | 2 | | | | | | | 34 | 26,5 | 0,323 |
| <i>Chiriguano</i> | VAV 6218 | 2000 | 22 | 6 | 1 | | | | | | | 29 | 24,1 | 0,276 |
| <i>Amarillo chico</i> | VAV 6476 | 1690 | 41 | 7 | 3 | | | | | | | 51 | 19,6 | 0,255 |
| <i>Blanco y ocho rayas</i> | VAV 6481 | 750 | 48 | 1 | 5 | 1 | | | | | | 55 | 12,7 | 0,255 |
| <i>Amarillo chico</i> | VAV 6484 | 2010 | 45 | | 2 | 2 | | | | | | 49 | 8,2 | 0,204 |
| <i>Orgullo cuarentón</i> | VAV 6482 | 910 | 44 | 4 | 1 | | | | | | | 49 | 10,2 | 0,122 |
| <i>Blanco y ocho rayas</i> | VAV 6483 | 1250 | 34 | | 2 | | | | | | | 36 | 5,5 | 0,111 |
| <i>Colorado</i> | VAV 6223 | 80 | 37 | 2 | | | | | | | | 39 | 5,1 | 0,051 |
| <i>Pichingá</i> | VAV 6170 | 80 | 42 | 1 | | | | | | | | 43 | 2,3 | 0,023 |
| <i>Altiplano</i> | VAV 6474 | 3520 | 40 | | | | | | | | | 40 | 0,0 | 0,000 |
| <i>Altiplano</i> | VAV 6473 | 3620 | 43 | | | | | | | | | 43 | 0,0 | 0,000 |
| Total | | | 692 | 220 | 102 | 66 | 26 | 9 | 2 | 2 | 1 | 1120 | 38,2 | |

Tabla 2. Frecuencia media de cromosomas B en 21 poblaciones nativas de maíz de diferentes alturas.

Frecuencia media de Bs - Altura de cultivo

Se realizó un análisis de correlación simple entre el número medio poblacional de cromosomas B y la altura de cultivo, encontrándose que están correlacionadas positivamente ($r=0,6355$; $p=0,0035$) (Figura 6).

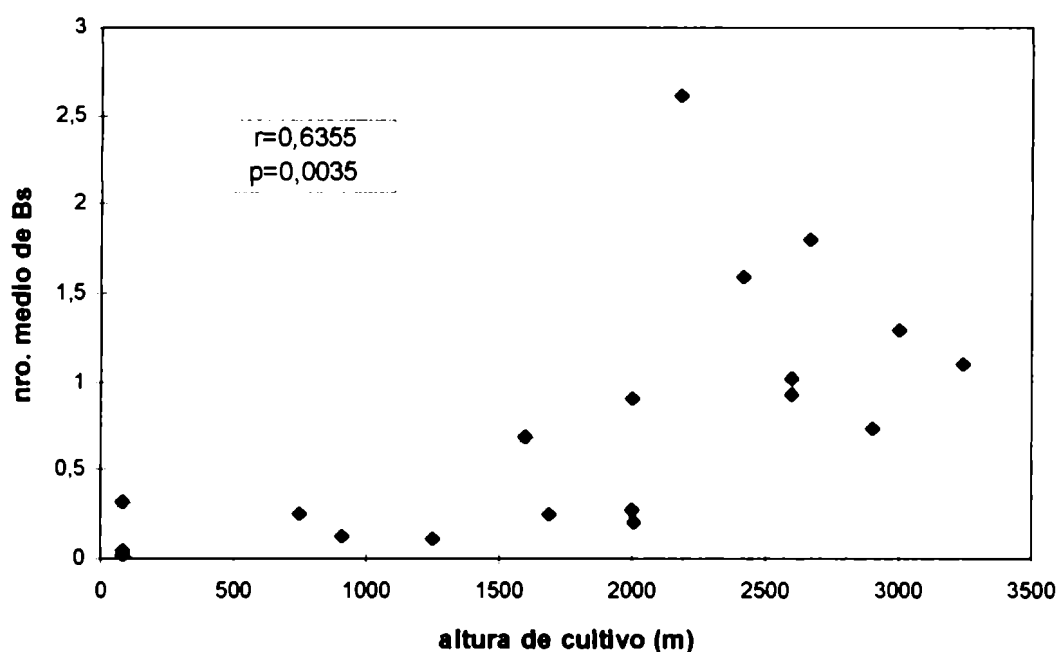


Figura 6. Correlación entre el número medio de Bs y la altura de cultivo.

La correlación entre el número medio poblacional de Bs y altura de cultivo resulta significativa sólo si se efectúa en aquellas poblaciones que se encuentran ubicadas en las regiones no marginales para la distribución habitual de maíz. Las poblaciones que no poseen cromosomas B son **VAV 6474** y **6473**

(pertenecientes a la raza *Altiplano*), procedentes de 3520 y 3620 m, respectivamente, se localizan en un área marginal, en la región cordillerana de la provincia de Jujuy, en condiciones ambientales extremas para éste cultivo. Cuando se las incluye en este análisis la correlación no es significativa ($r=0,3698$; $p=0,099$).

TAMAÑO DEL GENOMA

Tamaño del genoma

Se determinó el contenido de ADN en individuos sin Bs, $2n=20$ (A-ADN), en 17 de las 21 poblaciones estudiadas anteriormente, provenientes de diferentes alturas de cultivo (80-3620 m), y con diferentes frecuencias medias poblacionales de cromosomas B. Las mediciones fueron realizadas entre 3 y 18 individuos pertenecientes a cada población y se calcula un contenido de A-ADN medio en cada población (Tabla 3). Se realizó las mediciones en individuos que no poseen cromosomas B ($2n=20$), y así analizar la variación del contenido de A-ADN independientemente de la presencia de los Bs.

El contenido de A-ADN fue medido en un total de 107 individuos no portadores de cromosomas B. El contenido de A-ADN medio de las poblaciones varía de 5,0 pg (VAV 6167, Raza *Altiplano*) a 6,8 pg (VAV 6481, Raza *Blanco y Ocho Rayas*). La variación interpoblacional encontrada es del 36%.

Se realizó un análisis de correlación simple entre el contenido de A-ADN y la altura de cultivo en poblaciones que presentan polimorfismo numérico para cromosomas B. Se encontró que el contenido de A-ADN está negativamente correlacionado con la altura de cultivo ($r = -0,3134$; $p = 0,0022$) (Figura 7), de manera tal que las poblaciones cultivadas a mayores alturas poseen, en general, menor contenido de A-ADN.

| Raza | Población | Contenido de A-DNA (pg) | Cont. medio de A-DNA, X±SE (pg) (N) |
|----------------------------|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>Blanco</i> | VAV 6479 | 6,240; 6,400; 6,500 | 6,380 ± 0,076 (60) |
| <i>Blanco</i> | VAV 6485 | 5,520; 5,550; 5,790; 5,840; 6,050; 6,050 | 5,800 ± 0,094 (120) |
| <i>Amarillo grande</i> | VAV 6480 | 5,790; 5,840; 5,910; 5,970; 6,050; 6,340; 6,340; 6,600; | 6,105 ± 0,102 (160) |
| <i>Altiplano</i> | VAV 6167 | 4,310; 5,000; 5,280; 5,440 | 5,008 ± 0,250 (80) |
| <i>Harinoso</i> | VAV 6475 | 5,920; 6,280; 6,440; 6,450; 6,510; 6,710; 6,800; 6,820 | 6,491 ± 0,106 (160) |
| <i>Capia blanco</i> | VAV 6418 | 5,500; 5,510; 5,710; 5,710; 5,730 | 5,632 ± 0,052 (100) |
| <i>Amarillo chico</i> | VAV 6451 | 5,180; 5,230; 5,620; 5,640; 5,650; 6,670 | 5,665 ± 0,219 (120) |
| <i>Plisingallo</i> | VAV 6313 | 5,180; 5,630; 5,680; 5,770; 5,850; 5,940; 6,060; 6,060; 6,090; 6,130; 6,350; 6,380; 6,400; 6,500; 6,510 6,640; 6,720; 6,790; | 6,149 ± 0,101 (360) |
| <i>Capia rosado</i> | VAV 6162 | 5,430; 5,610; 6,180 | 5,740 ± 0,226 (60) |
| <i>Amarillo chico</i> | VAV 6476 | 5,710; 5,960; 6,090; 6,520; 6,560; 6,850 | 6,282 ± 0,176 (120) |
| <i>Blanco y ocho rayas</i> | VAV 6481 | 6,520; 6,730; 6,780; 6,790; 6,860; 6,860 | 6,757 ± 0,052 (120) |
| <i>Amarillo chico</i> | VAV 6484 | 6,090; 6,120; 6,180; 6,220; 6,400; 6,570; 6,880 | 6,351 ± 0,109 (140) |
| <i>Orgullo cuarentón</i> | VAV 6482 | 5,760; 6,130; 6,160; 6,270; 6,280; 6,290 | 6,148 ± 0,082 (120) |
| <i>Blanco y ocho rayas</i> | VAV 6483 | 6,420; 6,446; 6,580; 6,958 | 6,601 ± 0,124 (80) |
| <i>Pichingá</i> | VAV 6170 | 6,000; 6,048; 6,188; 6,450 | 6,172 ± 0,101 (80) |
| <i>Altiplano</i> | VAV 6474 | 6,250; 6,460; 6,490; 6,500; 6,640; 6,600; 6,660 | 6,514 ± 0,053 (140) |
| <i>Altiplano</i> | VAV 6473 | 5,880; 6,160; 6,280; 6,510; 7,050; 7,050 | 6,488 ± 0,196 (120) |

Tabla 3. Razas, altura de cultivo y contenido de ADN medio de individuos sin cromosomas B (A-ADN). (N): Numero de núcleos medidos.

Sin embargo, cuando se incluyen en el análisis las poblaciones VAV 6474 y 6473 (ambas pertenecientes a la Raza *Altiplano*), cuyos valores de contenido medio de A-ADN corresponden a casi los mayores encontrados (6,514 y 6,488 pg) respectivamente, cultivadas en regiones marginales para la distribución del maíz, el análisis de correlación resulta no significativo ($r = -0,0953$; $p = 0,33$).

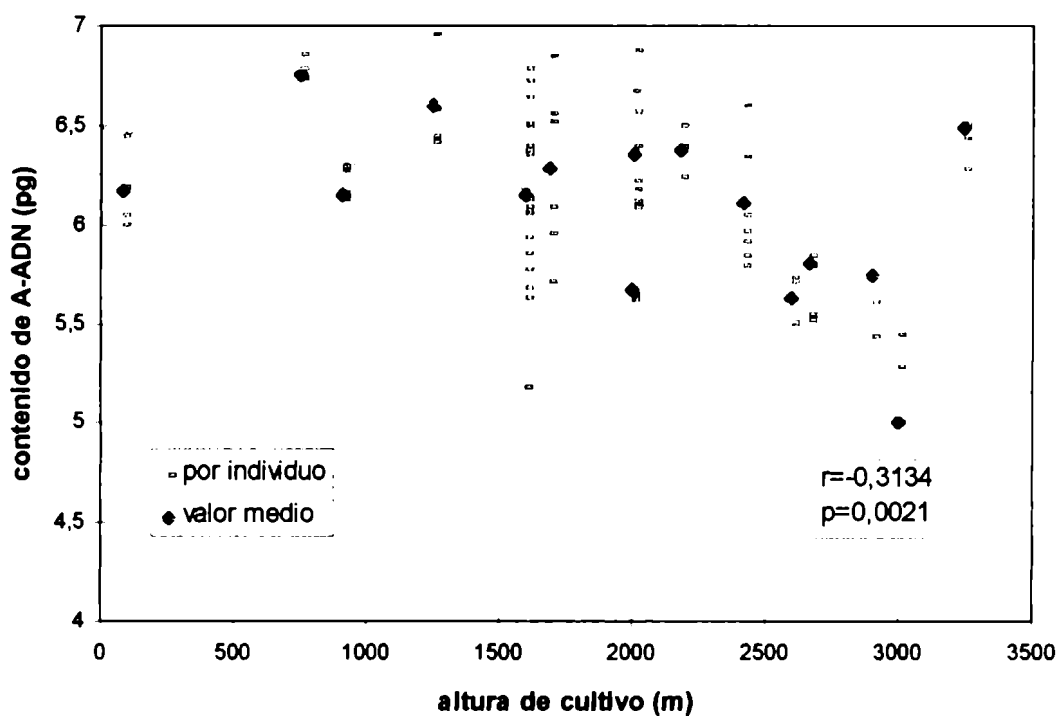


Figura 7. Correlación entre el contenido de A-ADN y la altura de cultivo

Tamaño del genoma - Frecuencia media de Bs

Mediante un análisis de correlación simple se encuentra que el tamaño del genoma, determinado a partir del total de individuos analizados en la tabla 3 (107 individuos sin cromosomas B), se correlaciona negativamente con el número medio de cromosomas B que poseen las 17 poblaciones ($r = -0,3379$, $p < 0,0001$), (Figura 8).

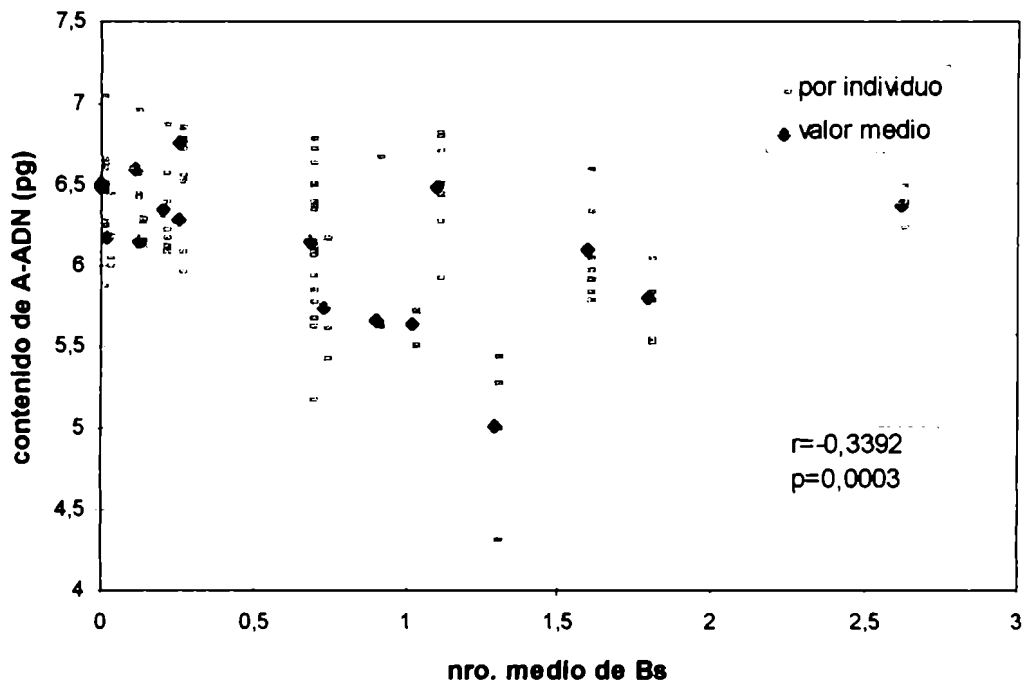


Figura 8. Correlación entre el contenido de A-ADN y frecuencia media de Bs en sus poblaciones

Dosis de Cromosomas B - Contenido de ADN

Se estudió la relación entre la dosis de cromosomas Bs y el contenido de ADN. Las poblaciones analizadas fueron: **VAV 6479** (raza *Blanco*), **VAV 6485** (raza *Blanco*), **VAV 6480** (raza *Amarillo grande*) y **VAV 6475** (raza *Harinoso*) cuyas frecuencias medias de individuos con Bs son 2,615; 1,795; 1,596 y 1,100, respectivamente. En la tabla 4 se presentan los valores medios de contenido de ADN que se midieron en individuos con diferentes dosis de cromosomas B (0, 1, 2, 3 y 4 Bs). Se analizó un total de 75 individuos. En la figura 9 se representa la variación del contenido de ADN medio de cada población en las diferentes dosis de cromosomas B.

| Población (Raza) | Contenido de ADN medio en diferentes dosis de Bs ($X \pm ES$) (pg) (nro. ind.) | | | | |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 0B | 1B | 2B | 3B | 4B |
| VAV 6479 (<i>Blanco</i>) | 6,409 \pm 0,086 (3) | 6,074 \pm 0,050 (6) | 6,375 \pm 0,070 (4) | 6,622 \pm 0,068 (4) | 6,656 \pm 0,104 (3) |
| VAV 6485 (<i>Blanco</i>) | 5,800 \pm 0,094 (6) | 6,310 \pm 0,072 (3) | 6,392 \pm 0,062 (4) | 6,599 \pm 0,146 (4) | |
| VAV 6480 (<i>Am.grande</i>) | 6,106 \pm 0,102 (8) | 6,085 \pm 0,083 (4) | 6,285 \pm 0,097 (4) | 6,423 \pm 0,016 (3) | |
| VAV 6475 (<i>Harinoso</i>) | 6,448 \pm 0,131 (6) | 5,786 \pm 0,145 (3) | 6,377 \pm 0,053 (4) | 6,592 \pm 0,081 (4) | 6,660 \pm 0,170 (2) |

Tabla 4. Contenido de ADN medio poblacional en diferentes dosis de cromosomas B.

Se realizó un ANOVA de dos factores (Modelo mixto) entre las cuatro poblaciones (Factor aleatorio) y las dosis 0, 1, 2 y 3 Bs (Factor fijo). Los valores de contenido de ADN medio total de cada población se calcula promediando el

contenido de ADN de todas las dosis. De ésta manera el contenido de ADN total ($X \pm E.S.$) de cada poblaciones es: $6,37 \pm 0,113$ (**VAV 6479**); $6,275 \pm 0,169$ (**VAV 6485**); $6,225 \pm 0,080$ (**VAV 6480**) y $6,300 \pm 0,177$ (**VAV 6475**). El contenido de ADN medio total de las poblaciones no presenta diferencias significativas entre sí ($F=1,3824$; $p=0,2580$). Cuando se compara las dosis de cromosomas B entre sí, las diferencias son marginalmente significativas ($F=3,622$; $p=0,057$), en cambio la interacción dosis-población resultó significativa ($F=4,3536$; $p=0,0003$) (Figura 9). Este resultado indica que el contenido de ADN de las 4 poblaciones no presentan el mismo comportamiento en las distintas dosis de Bs.

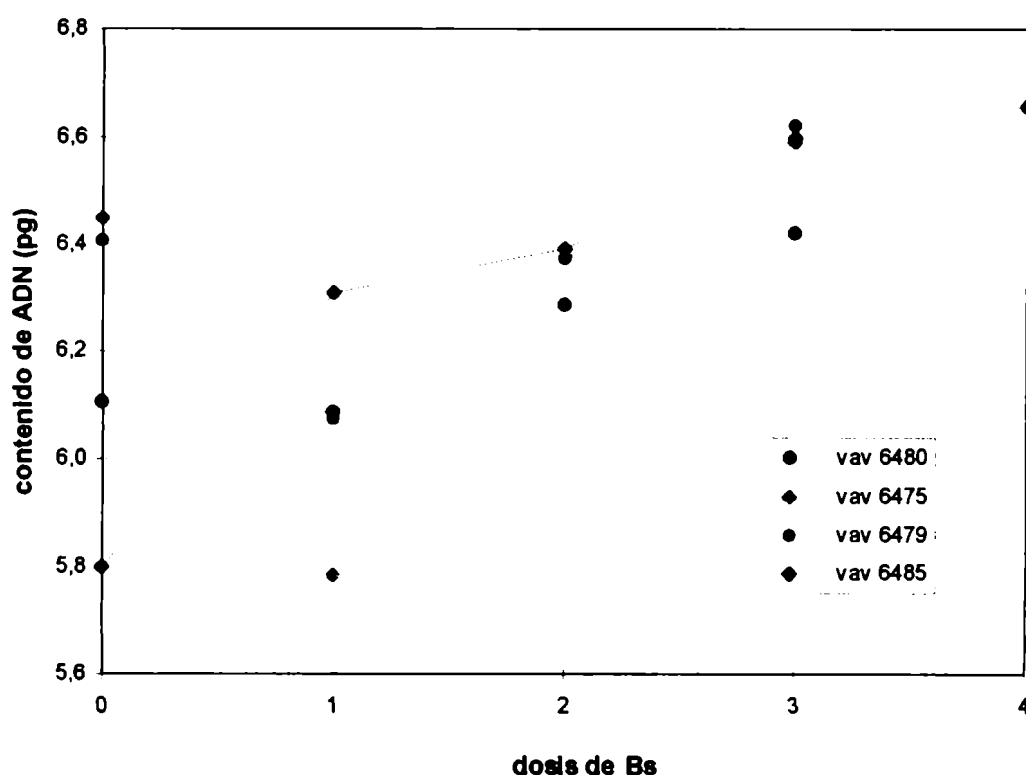


Figura 9. Contenido de ADN medio y dosis de cromosomas B en 4 poblaciones

Se estudió en cada una de las poblaciones la relación entre el contenido medio de ADN y la dosis de cromosomas B mediante un ANOVA de un factor y en los casos que resultó significativo se realizó un análisis de regresión lineal. Los resultados se resúmen a continuación:

Población VAV 6479: El ANOVA realizado tomando todas las dosis estudiadas (0B-4B) resultó significativo ($F=13,015$; $p=0,0001$). Mediante contrastes de Scheffé se determinó que solo las dosis 1B-3B y 1B-4B presentan diferencias significativas. El análisis de regresión lineal resultó significativo ($F=12,91$; $p=0,0023$), la formula es: $Y=6,14+1,2710 X$.

Población VAV 6485: El ANOVA resultó significativo, $F=12,86$; $p=0,0003$. Mediante contrastes de Scheffé se determinó que sólo las dosis 0B-1B, 0B-2B, 0B-3B, presentan diferencias significativas. El análisis de regresión lineal resultó significativo ($F=33,426$; $p<0,00001$) y la formula es: $Y=5,8623+2,6223X$.

Población VAV 6480: El ANOVA resultó no significativo ($F=1,8924$; $p=0,1743$).

Población VAV 6475: El ANOVA se realizó teniendo en cuenta todas las dosis estudiadas (0B-4B) y resultó significativo ($F=6,1068$; $p=0,0046$). Mediante contrastes de Scheffé se determinó que sólo las dosis 0B-1B, 1B-3B, 1B-4B, presentan diferencias significativas. El análisis de regresión lineal se realizó entre las dosis 1B-4B, resultando significativo $F=24,6665$; $p=0,0004$; la fórmula es: $Y=5,6403+2,9794 X$.

ANÁLISIS DE LA HETEROCROMATINA

Caracterización mediante técnicas de bandeo fluorescente y C

Para caracterizar la composición de la heterocromatina se empleó en forma secuencial, los fluorocromos DAPI y Cromomicina A₃ (CMA), siendo el primero específico para secuencias ricas en A-T y el segundo para secuencias ricas en G-C. Posteriormente se analizó la presencia de heterocromatina mediante la técnica de bandeo C y de ésta manera determinar si existe correspondencia entre las bandas detectadas mediante las dos técnicas.

Se analizaron 11 poblaciones: **VAV 6167**, **VAV 6473** y **VAV 6474** (pertenecientes a la raza *Altiplano*); **VAV 6451**, **VAV 6476** y **VAV 6484** (raza *Amarillo chico*), **VAV 6313** (raza *Pisingallo*), **VAV 6481** y **VAV 6483** (raza *Blanco y ocho rayas*), **VAV 6485** (raza *Blanco*) y **VAV 6475** (raza *Harinoso*).

El análisis se realizó en primer lugar en 71 individuos sin cromosomas B. Las poblaciones analizadas presentaron polimorfismo y politipismo para el número de bandas DAPI+ en su complemento A regular ($2n=20$) (Tabla 5). La mayoría de los individuos analizados de la población **VAV 6167** posee dos bandas DAPI+ (Figura 14), en las poblaciones **VAV 6473**, **VAV 6474** y **VAV 6485** los individuos poseen como máximo 3 bandas, en la población **VAV 6475**

los individuos poseen como máximo 4 bandas (Figura 18), las poblaciones **VAV 6451** y **VAV 6313** poseen como máximo 12 bandas DAPI+ (Figura 14) y la población **VAV 6481** los individuos poseen como máximo 14 bandas DAPI+ (Figura 14). Además las poblaciones pertenecientes a la raza *Amarillo chico* difieren con respecto al número de bandas DAPI+, encontrándose entre 2-3 bandas DAPI+ en la población **VAV 6484**, 3-5 bandas DAPI+ en la **VAV 6476** y 6 -12 bandas DAPI+ en la **VAV 6451**.

Todas las poblaciones presentaron una banda CMA+ proximal a la región del NOR (región organizadora del nucleolo) en ambos cromosomas homólogos, (par cromosómico 6) (Figura 15 y 16).

Luego de caracterizar la heterocromatina mediante bandeo fluorescente los mismos preparados fueron coloreados posteriormente con la técnica de bandeo C. Se encontró que la posición de las bandas DAPI+ coinciden con las bandas C+. Las bandas CMA+ proximales al NOR no siempre son detectadas como bandas C en ésta región ya que se colorean con una menor intensidad (Figura 17).

En la mayoría de los individuos mediante la técnica de bandeo C se detectaron bandas centroméricas y en algunos casos se visualizaron como puntos (dots) en el lugar del centrómero en cada una de las cromátidas hermanas (Figura 17). Dado que la secuencia de ADN de éstas bandas es

diferentes a los *knobs* paquiténicos no es tomada en cuenta en los posteriores análisis.

En todos los individuos de las 11 poblaciones analizadas las bandas DAPI+ o bandas C+ se encuentran en uno de los brazos cromosómicos y en posición terminal o subterminal (Figura 14 a 21) excepto en cuatro individuos: uno perteneciente a la población **VAV 6481**, dos pertenecientes a la población **VAV 6483** y uno a la población **VAV 6451**, presentaron 2 bandas una en cada brazo cromosómico en posición subterminal.

Algunas de las poblaciones estudiadas presentaron heteromorfismo para el número y tamaño de bandas DAPI+ y C+. Por ejemplo, las poblaciones: **VAV 6313**, **VAV 6475**, **VAV 6485**, **VAV 6451**, **VAV 6483**, **VAV 6481** y **VAV 6476** se encuentran individuos heterocigotas para la presencia de la banda subterminal del brazo largo del cromosoma 6 (sm) y además ,en las tres últimas poblaciones, para el tamaño de la misma banda (Figura 14 a 21).

Heterocromatina y Tamaño del genoma

Se analizó la relación entre el tamaño del genoma (A-ADN) y el número de bandas DAPI+. Se calculó en individuos sin cromosomas B pertenecientes a las 11 poblaciones estudiadas, el número medio de bandas DAPI+ (tabla 5).

| Raza | Población | Altura (m) | Nro medio de Bs | A-ADN medio (pg) | Rango de bandas | Nro. medio de bandas (Nro. ind.) |
|-----------------------------------|------------------|-------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------------------------|
| <i>Pisingallo</i> | VAV 6313 | 1600 | 0,685 | 6,149 | 6 - 12 | 10,25 (4) |
| <i>Blanco y ocho rayas</i> | VAV 6481 | 750 | 0,255 | 6,757 | 6 - 14 | 9,66 (3) |
| <i>Blanco y ocho rayas</i> | VAV 6483 | 1250 | 0,111 | 6,601 | 7 - 12 | 9,50 (6) |
| <i>Amarillo chico</i> | VAV 6451 | 2000 | 0,900 | 5,665 | 5 - 12 | 7,40 (5) |
| <i>Amarillo chico</i> | VAV 6476 | 1690 | 0,255 | 6,282 | 3 - 6 | 4,40 (5) |
| <i>Harinoso</i> | VAV 6475 | 3240 | 1,100 | 6,491 | 2 - 4 | 3,00 (18) |
| <i>Amarillo chico</i> | VAV 6484 | 2010 | 0,204 | 6,351 | 2 - 4 | 2,60 (5) |
| <i>Altiplano</i> | VAV 6473 | 3620 | 0,000 | 6,488 | 2 - 3 | 2,50 (6) |
| <i>Altiplano</i> | VAV 6167 | 3000 | 1,0294 | 5,008 | 2 - 3 | 2,33 (3) |
| <i>Altiplano</i> | VAV 6474 | 3520 | 0,000 | 6,514 | 2 - 3 | 2,25 (4) |
| <i>Blanco</i> | VAV 6485 | 2670 | 1,975 | 5,800 | 1 - 3 | 2,08 (12) |

Tabla 5. Poblaciones, altura de cultivo, contenido de A-ADN medio, rango y número medio de bandas DAPI+ (en individuos sin cromosomas B).

Se realiza un análisis de correlación entre el contenido de A-ADN medio y el número de bandas heterocromáticas DAPI+ en las poblaciones, resultando una correlación no significativa ($r= 0,2516$; $p= 0,049$).

Como puede observarse en la tabla 5 la población **VAV 6167** con el menor contenido de ADN (5,008 pg) presenta un bajo número medio de bandas DAPI+ (2,33 bandas) y las poblaciones **VAV 6313**, **VAV 6483** y **VAV 6481** (con

mayor contenido de A-ADN, 6,149, 6,601 y 6,756 pg, respectivamente) presentan un mayor número medio de bandas DAPI+ (10,25; 9,5 y 9,66 bandas, respectivamente). En cambio, las poblaciones con contenido de A-ADN medio intermedio no siempre presentaron números medio de bandas intermedios, por ejemplo, las poblaciones **VAV 6485** y **VAV 6475** difieren en su contenido medio de A-ADN (5,80 y 6,491 pg respectivamente), sin embargo, sólo difieren en una banda (2,08 y 3,0, respectivamente).

De la misma manera, el número medio de bandas DAPI+ presentes en la raza **Altiplano** no se relaciona con el contenido de A-ADN; las poblaciones **VAV 6473** (6,488 pg) y **VAV 6474** (6,514 pg) poseen mayor contenido de A-ADN medio que la población **VAV 6167** (5,008 pg) sin embargo, no se diferencian con respecto al número medio de bandas DAPI+, (2,50, 2,25 y 2,33, respectivamente) (Tabla 5).

Las poblaciones estudiadas pertenecientes a la raza **Amarillo chico** (**VAV 6451**, **VAV 6476** y **VAV 6484**) difieren en el número medio de bandas DAPI+ (7,4; 4,4 y 2,6, respectivamente), presentando variación intrarracial en el número de bandas heterocromáticas (Tabla 5). En cambio las poblaciones analizadas de la raza **Blanco y ocho rayas** (**VAV 6481** y **VAV 6483**) difieren poco en el número medio de bandas DAPI+ (9,66 y 9,50, respectivamente).

Heterocromatina, Número medio de Cromosomas B y Altura de cultivo

Mediante una correlación simple se analiza la relación entre el número medio de bandas DAPI+ en los cromosomas del complemento regular (As), con la altura de cultivo y el número medio de cromosomas B. Se obtuvo que, el número de bandas DAPI+ se correlaciona negativamente con la altura de cultivo ($r = -0,726$; $p < 0,0001$) (Figura 10). Se observa que a alturas mayores a los 2000 m el número medio y la variación del número de bandas es menor (Figura 10).

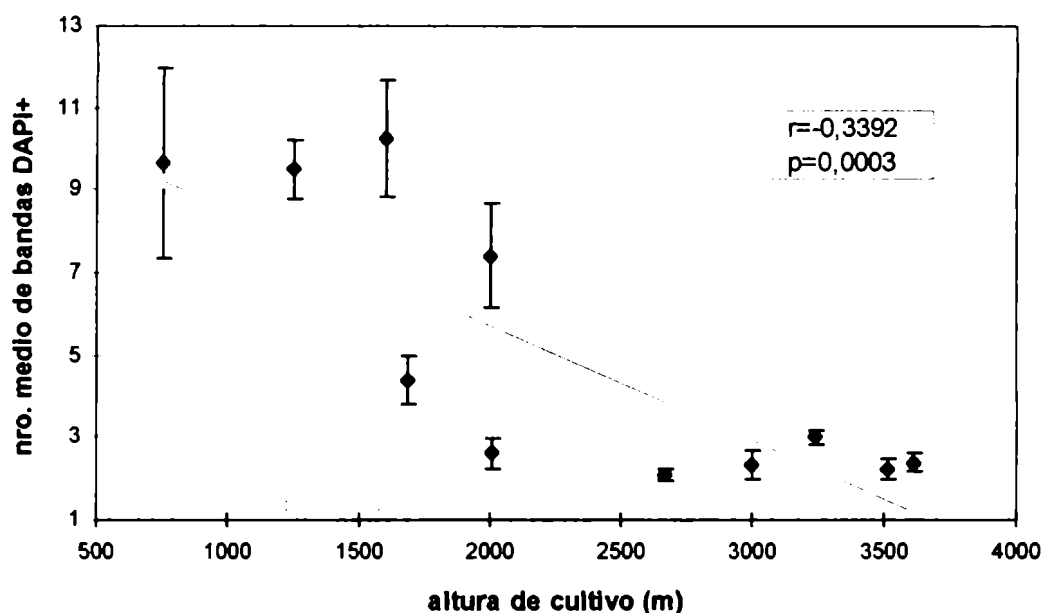


Figura 10. Correlación entre el número de bandas DAPI+ y la altura de cultivo de 11 poblaciones.

El análisis de correlación simple entre el número de bandas DAPI+ y el número medio de cromosomas B resultó negativo ($r = -0,338$; $p = 0,0039$) (Figura

11). En cambio sí al calcular la correlación entre el número de bandas DAPI+ y el número medio de Bs se incluye sólo a las poblaciones que presentan polimorfismo numérico para cromosomas B el coeficiente de correlación es mayor ($r=-0.545$; $p< 0.0001$).

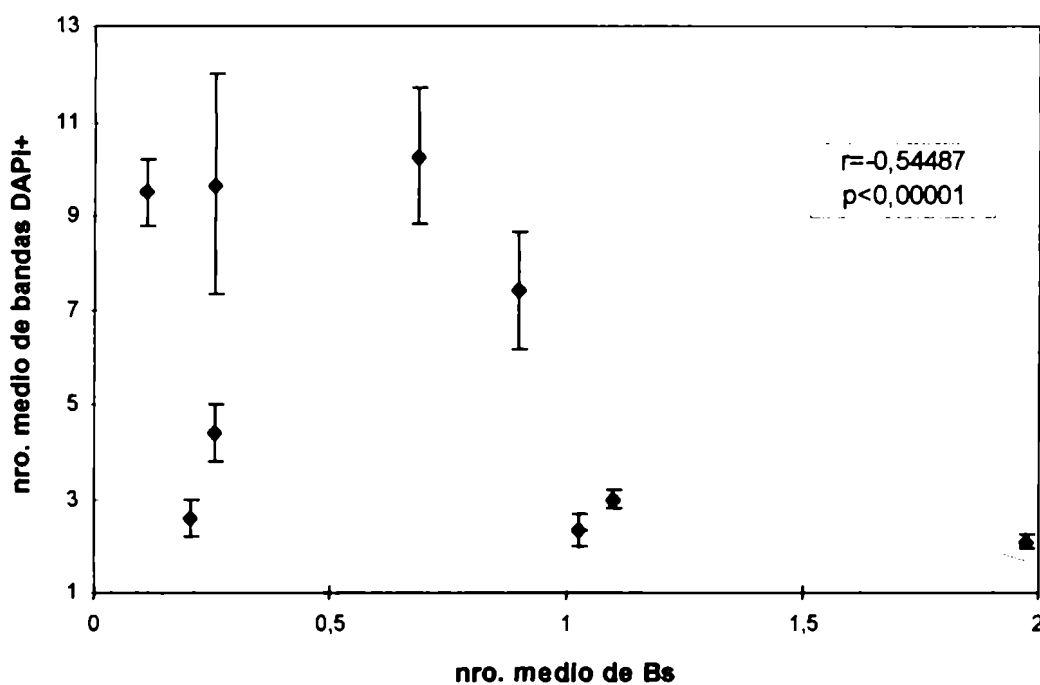


Figura 11. Correlación entre el número de bandas DAPI+ y el número medio de cromosomas B en 11 poblaciones.

Heterocromatina y Dosis de Cromosomas B

Se estudió la relación entre el patrón de bandeo DAPI+, en los cromosomas del complemento regular (As), y la distinta dosis de cromosomas B (0 -3Bs) en las poblaciones **VAV 6475** (raza **Harinoso**) y **VAV 6485** (raza

Blanco). En estas poblaciones previamente se analizó la variación del contenido de ADN con la dosis de cromosomas B (Tabla 4 y Figura 9) y mostraron un comportamiento extremo en las dosis 0B y 1B.

En la población **VAV 6475** los individuos presentaron 2, 3 y 4 bandas DAPI+ (Tabla 6, Figura 20 y 21); las bandas se encuentran en solo dos pares cromosómicos (6 y 9). Los individuos son homocigotas para la presencia de una banda DAPI+ en el par 9; en cambio el par 6 se encuentra en estado polimórfico para una banda DAPI+, es decir, que los individuos analizados presentan 2 bandas, 1 banda o ninguna banda en el par 6. Debido a que el par 9 no aporta variación al número de bandas DAPI+ no se tiene en cuenta para el análisis con la dosis de cromosomas B.

En la tabla 6 se encuentran los resultados del análisis del número medio de bandas DAPI+ en individuos sin cromosomas B. Se analizaron 44 individuos en total, el número medio de bandas DAPI+ es 1 en individuos de 0B (18 individuos), el número medio de bandas DAPI+ presentes en individuos con 1, 2 y 3 Bs es 0,5, 0,36 y 0,4, respectivamente, en un total de 26 individuos analizados.

En ésta población se analizó la distribución del número de bandas en individuos con y sin cromosomas B por medio de una prueba de independencia. El estadístico resultó significativo, χ^2 Yates=5,76; $p= 0,0164$, es decir, que el

número de bandas DAPI+ que poseen los cromosomas del complemento normal (As) no es independiente de la presencia de cromosomas B en los individuos de ésta población (Tabla 6 y Figura 12).

| Dosis de Bs | Nro de individuos con diferente número de bandas DAPI+ en el cromosoma 6 (0-2 bandas) | | | | nro. medio de bandas |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---|---|-------|----------------------|
| | 0 | 1 | 2 | total | |
| 0B | 5 | 8 | 5 | 18 | 1.00 |
| 1B | 6 | 3 | 1 | 10 | 0,50 |
| 2B | 9 | — | 2 | 11 | 0,36 |
| 3B | 3 | 2 | — | 5 | 0,40 |

Tabla 6. Distribución de frecuencias del número de bandas DAPI+ en individuos con distinta dosis de cromosomas B de la población VAV 6475.

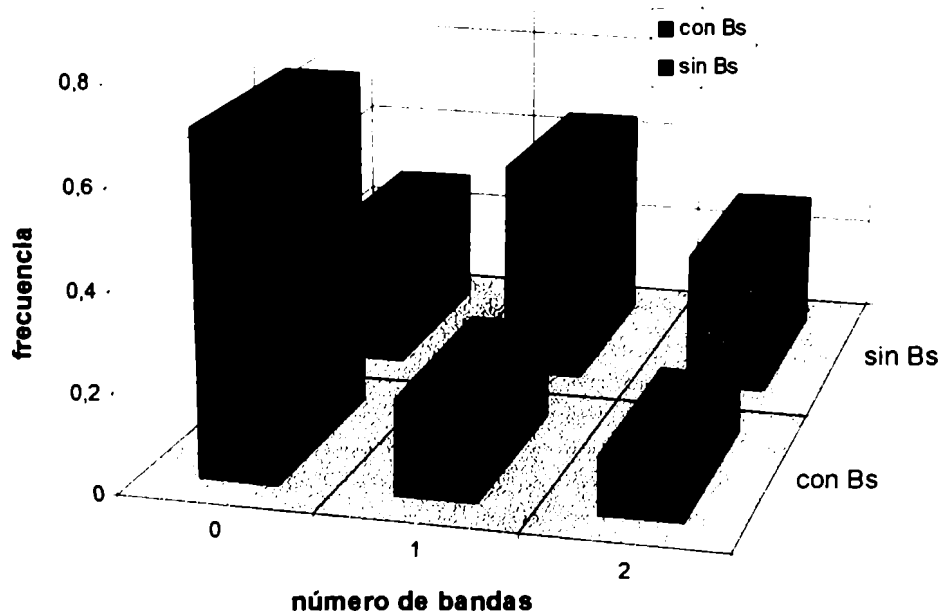


Figura 12. Distribución de frecuencias de bandas DAPI+ en individuos con y sin Bs en la población VAV 6475.

Una tendencia similar es observada en otras poblaciones, a pesar del reducido número de individuos estudiados, los individuos portadores de cromosomas B poseen menor número de bandas DAPI+ que el máximo número de éstas bandas hallado en los individuos sin Bs. Por ejemplo, en la población **VAV 6451** un individuo con 2Bs tiene 5 bandas DAPI+, 2 individuos con 1B tienen 8 bandas DAPI+ (Figura 20) mientras que, el rango de los individuos sin Bs es entre 5 y 12 bandas DAPI+ (Figura 14 y 21). En la población **VAV 6476**, los individuos con 1B tienen 3 y 5 bandas DAPI+, con 2Bs tienen 4 bandas (Figura 20), mientras que, el rango de los individuos sin Bs es entre 3 y 6 bandas DAPI+ (Figura 21). En la población **VAV 6481**, dos individuos con 2Bs tienen 8 bandas DAPI+ (Figura 20), y el rango de los individuos sin cromosomas B es 6 - 14 bandas (Figura 21).

| Dosis de Bs | Nro de individuos con diferente número de bandas DAPI+ en los cromosomas A (1-3 bandas) | | | | nro. medio de bandas |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|---|---|-------|----------------------|
| | 1 | 2 | 3 | total | |
| 0B | 1 | 9 | 2 | 12 | 2.083 |
| 1B | 1 | 6 | — | 7 | 1.857 |
| 2B | | 2 | 2 | 4 | 2.500 |
| 3B | -- | 5 | 1 | 6 | 2.166 |

Tabla 7. Distribución de frecuencias del número de bandas DAPI+ en individuos con distinta dosis de cromosomas B de la población **VAV 6485**.

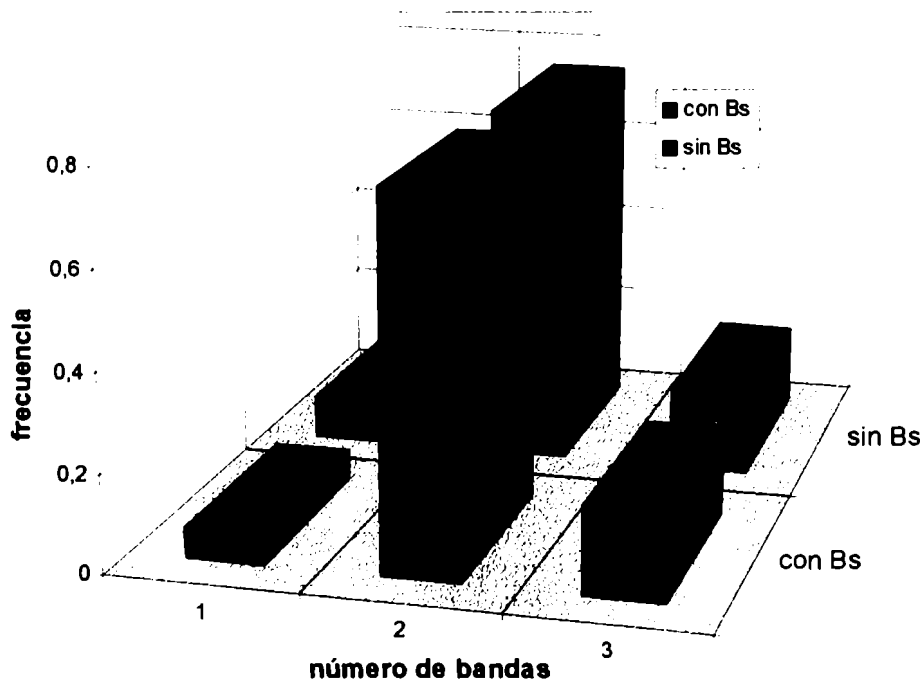


Figura 13. Distribución de frecuencias de bandas DAPI+ en individuos con y sin Bs de la población **VAV 6485**.

Los individuos de la población **VAV 6485** presentaron 1, 2 y 3 bandas DAPI+ en 29 individuos analizados. Los pares cromosómicos que poseen bandas DAPI+ son los mismos que los de la población **VAV 6475** (par 6 y 9), pero en este caso, la frecuencia de individuos heterocigotas para la presencia de la banda DAPI+ en el par 6 es menor y además solo en dos casos se encontró individuos heterocigotas para el par 9 (Tabla 7). Por otro lado, en ésta población no se pudo calcular un χ^2 debido a que el número de individuos que presentaron 1 y 3 bandas fue reducido, en los individuos con y sin cromosomas

B. Sin embargo, el número medio de bandas entre individuos 0B e individuos con Bs es similar, permitiendo asumir que las diferencias no son significativas. El número medio de bandas en individuos sin Bs y en individuos con Bs (1-3B) es 2,08 y 2,12, respectivamente. Es decir que, en ésta población la distribución de bandas DAPI+ en los cromosomas A es independiente de la presencia de cromosomas B (Tabla 7, Figura 13).

Los cromosomas B fueron analizados mediante bandeo fluorescente. En todas las poblaciones se evidencia una banda DAPI+ en la región proximal al centrómero mientras que, el resto del cromosoma B muestra una coloración tenue uniforme similar a la que presentan los cromosomas A (Figura 16, 18,19 y 20).

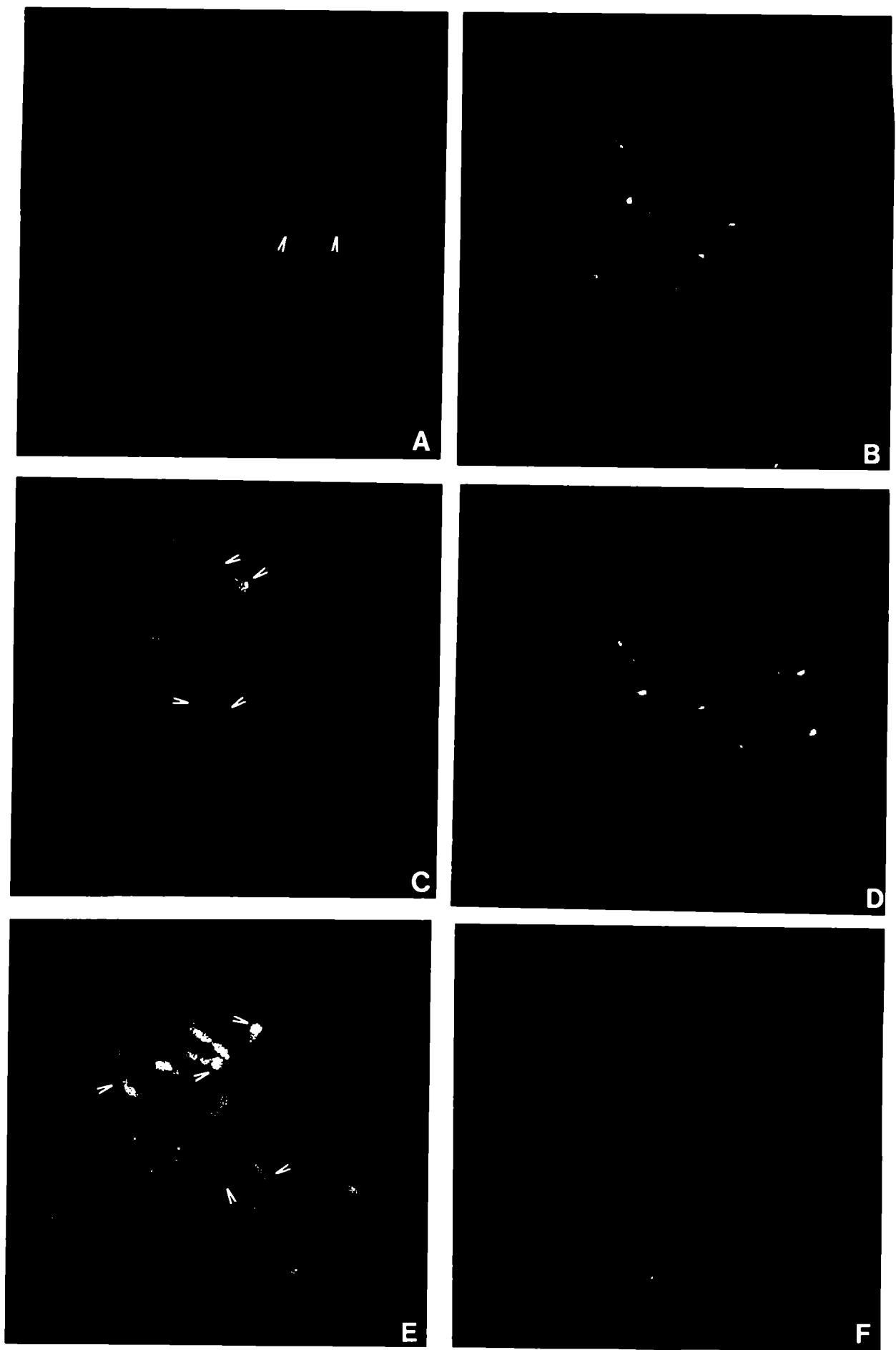


Figura 14. Bando DAPI en diferentes poblaciones, $2n=20$. A) VAV 6167, B) VAV 6313C) y D) VAV 6451, E y F) VAV 6481.

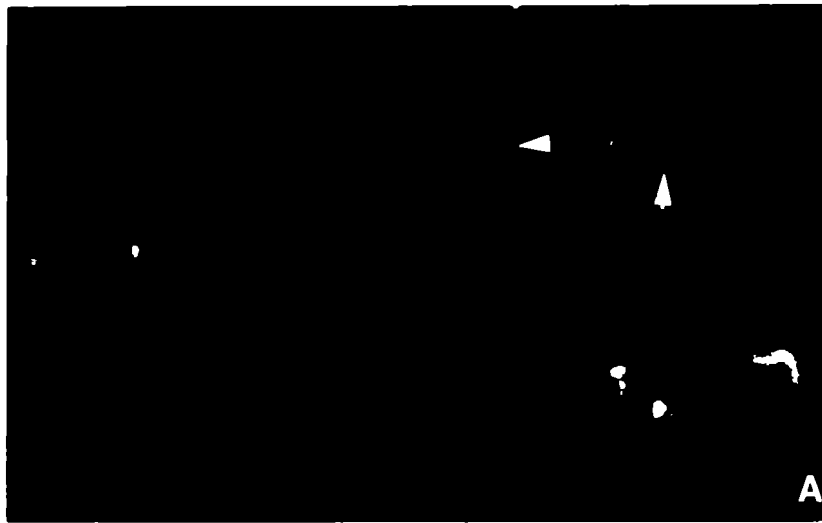


Figura 15. La misma célula, $2n=20$, en la población VAV 6451
A) Bando DAPI, B) Bando CMA.

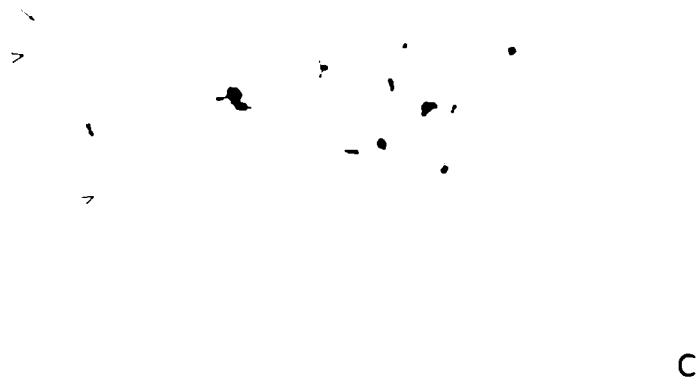
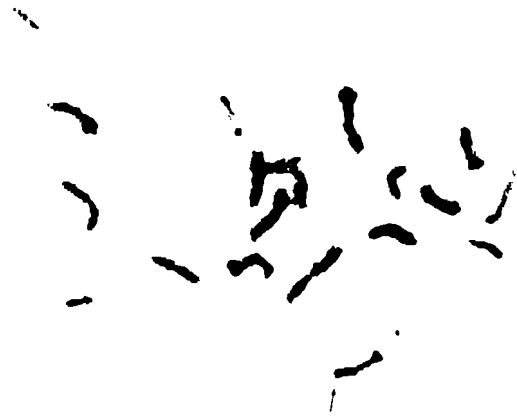


Figura 16. La misma célula $2n=20+2B$, en la población VAV 6481. A) Bando DAPI, B) Bando CMA, C) Bando C



A



B

Figura 17. Bando C. $2n=20$ en la población VAV 6476.

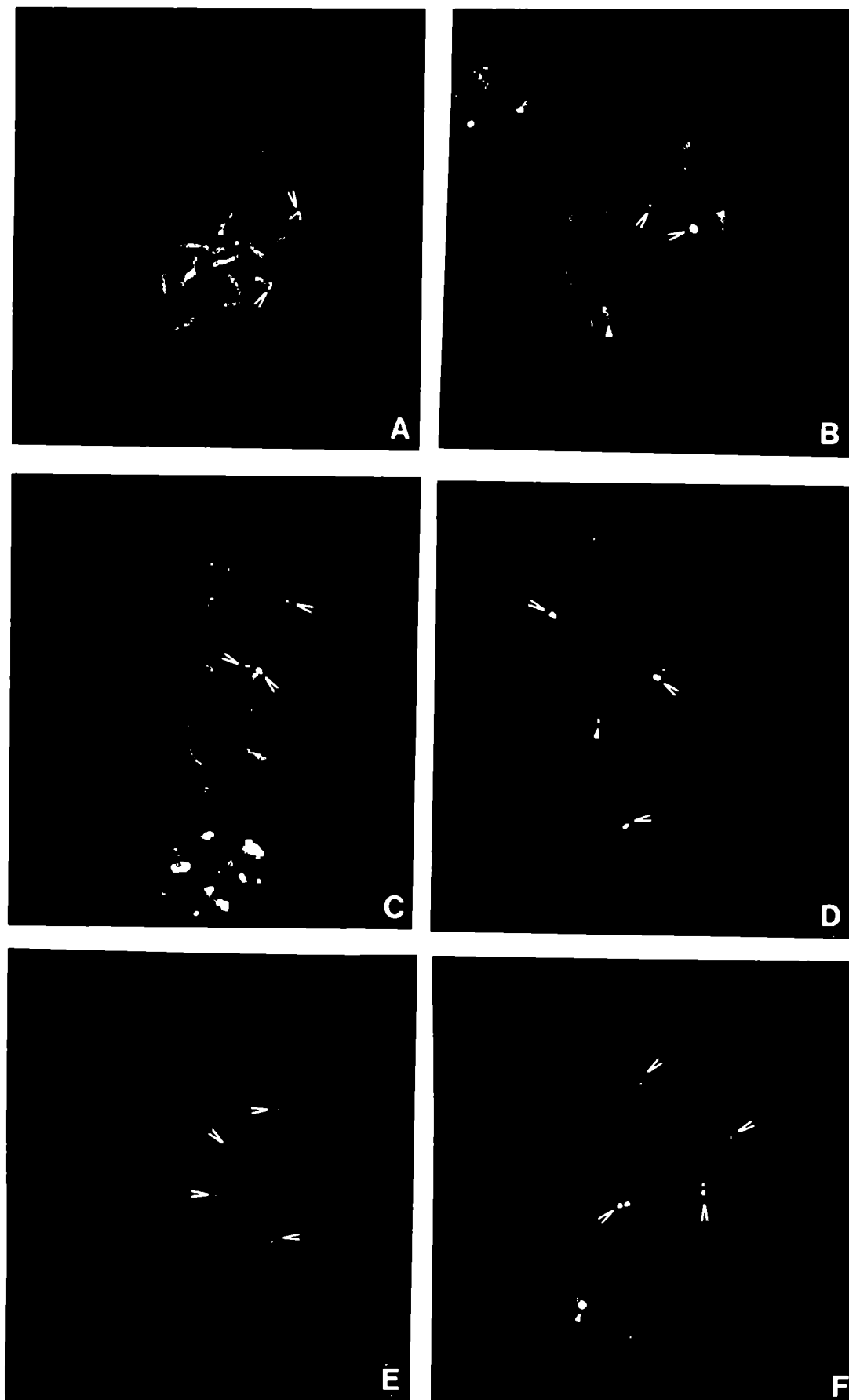


Figura 18. Bando DAPI en la Poblacion **VAV 6475**. A) ,C) y E) $2n= 20$,
B), D) y F) $2n=20+1B$.

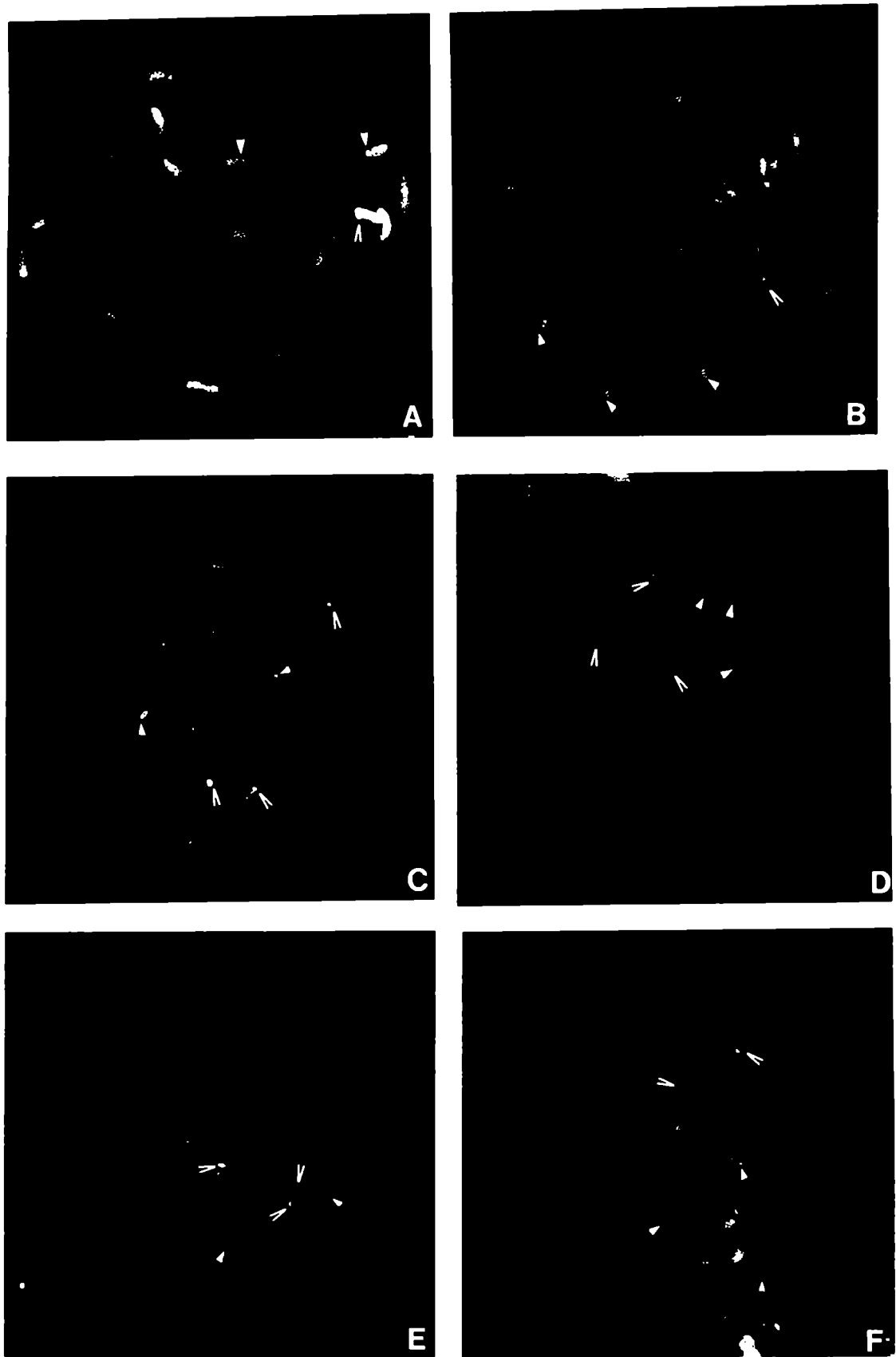


Figura 19. Bando DAPI en la población VAV 6475. A) ,C) y E) $2n= 20 +2Bs$,
B), D) y F) $2n=20+3Bs$.

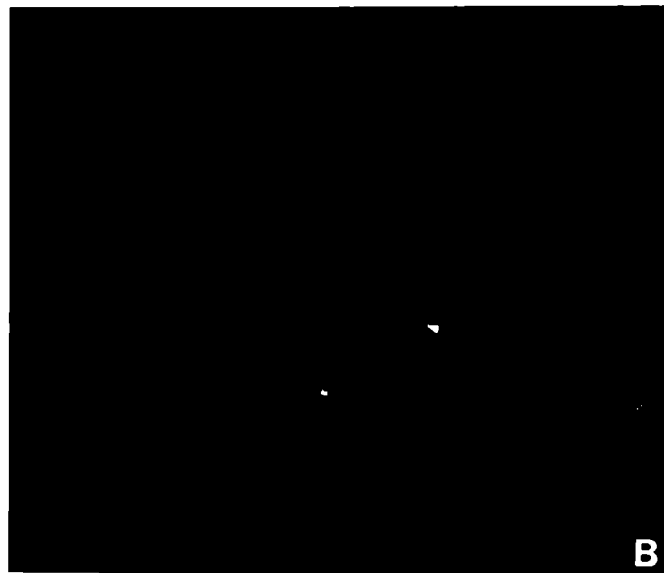
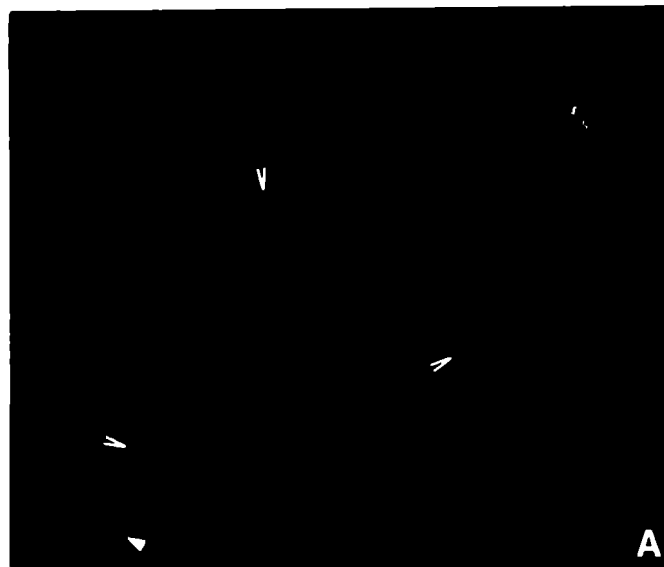


Figura 20. Bando DAPI en individuos con Bs de diferentes poblaciones.
A) VAV 6476, 20+1B, B) VAV 6451, 20+1B, C) VAV 6481, 20+2B.

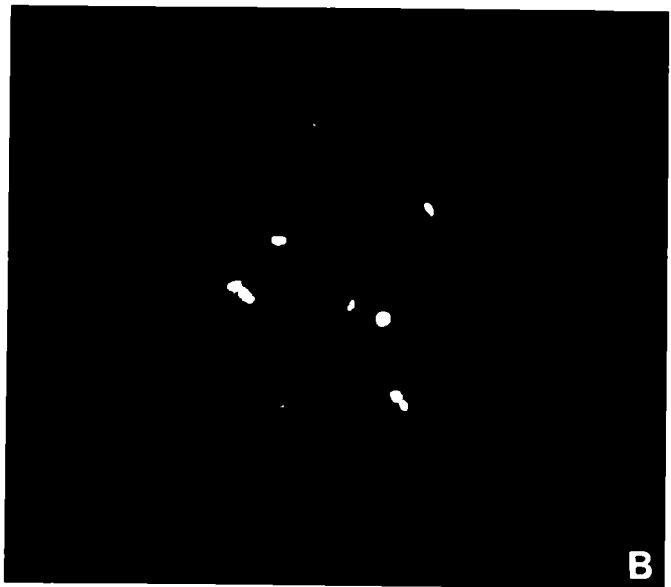


Figura 21. Bando DAPI en individuos sin Bs de diferentes poblaciones.
A) VAV 6476, B) VAV 6451, C) VAV 6481.

TASA DE TRANSMISIÓN FEMENINA DE CROMOSOMAS B

Tasa de transmisión de cromosomas B en la G0

En la población **VAV 6313** de la raza *Pisingallo* se analizó la tasa de transmisión femenina de cromosomas B. Se realizaron 20 cruzamientos entre plantas f. 1B x m. 0B (Figura 3) y se obtiene la progenie que constituye la primer generación (**G0**). En la tabla 8, se muestra la distribución del número de cromosomas B y la tasa de transmisión a la progenie (T_{fB}) en la **G0**. La T_{fB} se calcula como el cociente entre el número medio de Bs de la progenie y el número de B del progenitor materno. La tasa de transmisión media femenina de Bs es $T_{fB} \pm E.S = 0,47 \pm 0,02$, el rango de variación es 0,31 - 0,58. Se analizaron en total 704 individuos, la frecuencia de individuos con 0B es 54,4%, con 1B 45,3% y con 2B 0,3%. La aparición de individuos portadores de 2B es debido a la migración de ambas cromátidas del univalente B al mismo polo durante la anafase meiótica.

Las **G0** que mostraron las menores y las mayores tasas de transmisión de cromosomas B por vía materna fueron seleccionadas para constituir los progenitores de la siguiente generación (**G1**). En este caso las progenies corresponden a los cruzamientos 1 y 2 ambos con las mayores tasas de transmisión de cromosomas B $T_{fB} = 0,58$, y los cruzamientos 19 y 20 con las menores tasas de transmisión, $T_{fB} = 0,31$ y $0,37$ respectivamente (Tabla 8).

| Cruzamiento | Bs en G0 | | | Total | Tasa de transmisión |
|--------------|------------|------------|----------|------------|---------------------|
| | 0B | 1B | 2B | | |
| 1* | 12 | 13 | 1 | 26 | 0,58 |
| 2* | 11 | 15 | | 26 | 0,58 |
| 3 | 17 | 20 | | 37 | 0,54 |
| 4 | 27 | 28 | 1 | 56 | 0,54 |
| 5 | 11 | 13 | | 24 | 0,54 |
| 6 | 11 | 13 | | 24 | 0,54 |
| 7 | 12 | 13 | | 25 | 0,52 |
| 8 | 26 | 28 | | 54 | 0,52 |
| 9 | 11 | 12 | | 23 | 0,52 |
| 10 | 12 | 11 | | 23 | 0,48 |
| 11 | 29 | 27 | | 56 | 0,48 |
| 12 | 12 | 11 | | 23 | 0,48 |
| 13 | 14 | 12 | | 26 | 0,46 |
| 14 | 14 | 10 | | 24 | 0,42 |
| 15 | 25 | 17 | | 42 | 0,40 |
| 16 | 15 | 10 | | 25 | 0,40 |
| 17 | 28 | 17 | | 45 | 0,38 |
| 18 | 15 | 9 | | 24 | 0,38 |
| 19** | 37 | 22 | | 59 | 0,37 |
| 20** | 40 | 18 | | 58 | 0,31 |
| Total | 383 | 319 | 2 | 704 | Tt=0,47±0,02 |

Tabla 8. Distribución del número de B en la G0, los cruzamientos señalados con un asterisco fueron seleccionados por su alta tasa de transmisión y con dos asteriscos por su baja tasa de transmisión.

Tasa de transmisión de cromosomas B en la G1

1. Clase de alta tasa de transmisión (G1fa)

Se realizaron 12 cruzamientos f. 1B x m. 0B a partir de las plantas que fueron seleccionadas por su alta tasa de transmisión provenientes de la G0, la progenie resultante se denominó generación 1 de alta tasa de transmisión femenina (G1fa) (Figura 3).

| Cruzamiento | Bs en G1 | | | Total | Tasa de transmisión |
|--------------|------------|------------|----------|------------|----------------------|
| | 0B | 1B | 2B | | |
| 1 | 11 | 15 | | 26 | 0,58 |
| 2 | 11 | 14 | | 25 | 0,56 |
| 3 | 11 | 13 | | 24 | 0,54 |
| 4 | 12 | 14 | | 26 | 0,54 |
| 5 | 11 | 13 | | 24 | 0,54 |
| 6 | 12 | 13 | | 25 | 0,52 |
| 7* | 32 | 33 | 1 | 66 | 0,53 |
| 8 | 14 | 12 | | 26 | 0,46 |
| 9* | 25 | 23 | | 48 | 0,48 |
| 10 | 15 | 10 | | 25 | 0,40 |
| 11 | 14 | 9 | | 23 | 0,39 |
| 12 | 18 | 7 | | 25 | 0,28 |
| Total | 186 | 176 | 1 | 363 | Tt=0,485±0,02 |

Tabla 9. Distribución del número de B en la G1fa, los cruzamientos señalados con un asterisco fueron seleccionados por su alta tasa de transmisión.

La T_{f_B} de la **G1fa** es $0,48 \pm 0,02$ (Tabla 9), el rango de variación es 0,28 - 0,58. Se analizaron en total 363 individuos, de los cuales 186 presentaron 0B (51,24%), 176 individuos 1B (48,49%) y 1 individuo 2B (0,27%).

Mediante un ANOVA se compararon las tasas medias de transmisión entre la **G0** ($T_{f_B} \pm E.S. = 0,472 \pm 0,02$) y **G1fa** ($T_{f_B} = 0,48 \pm 0,02$), el análisis indicó que no difieren de manera significativa entre sí ($F = 0,189$; $p = 0,6718$) (Figura 22).

2. Clase de baja tasa de transmisión (G1fb)

A partir de los individuos provenientes de los cruzamientos que fueron seleccionados por su baja tasa de transmisión por vía materna en la **G0**, se realizaron cruzamientos f. 1B x m. 0B y se obtuvo la **G1fb** (Figura 3). La tasa de transmisión media femenina de cromosomas B a la progenie es $T_{f_B} \pm E.S. = 0,40 \pm 0,02$ (Tabla 10), el rango de variación es 0,28 - 0,54. En la **G1fb** se analizaron 431 individuos, de los cuales 267 presentaron 0B (61,95%) y 164 individuos presentaron 1B (38,05%).

Mediante un ANOVA se compararon las tasas de transmisión medias femenina de cromosomas B a la progenie de la **G1fb** ($T_{f_B} \pm E.S. = 0,40 \pm 0,02$) y **G0f** ($T_{f_B} \pm E.S. = 0,47 \pm 0,02$). El análisis indicó que difieren significativamente entre sí ($F = 5,719$; $p = 0,0233$). También, se comparó la T_{f_B}

de la **G1fb** ($Tt_{fb} \pm E.S. = 0,405 \pm 0,0215$) y de la **G1fa** ($Tt_{fb} \pm E.S. = 0,48 \pm 0,02$). El análisis indicó que difieren significativamente entre sí ($F=5,755$; $p=0,0254$) (Figura 22).

| Cruzamiento | Bs en G1 | | | Total | Tasa de transmisión |
|--------------|------------|------------|----------|------------|---------------------|
| | 0B | 1B | 2B | | |
| 1 | 12 | 14 | | 26 | 0,54 |
| 2 | 12 | 12 | | 24 | 0,50 |
| 3 | 13 | 12 | | 25 | 0,48 |
| 4 | 14 | 11 | | 25 | 0,44 |
| 5 | 17 | 12 | | 29 | 0,41 |
| 6 | 18 | 12 | | 30 | 0,40 |
| 7 | 17 | 11 | | 28 | 0,39 |
| 8* | 45 | 27 | | 72 | 0,37 |
| 9 | 16 | 9 | | 25 | 0,36 |
| 10 | 17 | 9 | | 26 | 0,35 |
| 11 | 16 | 8 | | 24 | 0,33 |
| 12* | 70 | 27 | | 97 | 0,28 |
| Total | 267 | 164 | 0 | 431 | Tt=0,40±0,02 |

Tabla 10. Distribución del número de Bs en la **G1fb**, los cruzamientos señalados con un asterisco fueron seleccionados por su baja tasa de transmisión.

Tasa de transmisión de cromosomas B en la G2

Nuevamente a partir de las progenies de la **G1fb** y **G1fa** que presentaron las menores y casi las mayores tasas de transmisión, respectivamente, fueron

seleccionadas para constituir los progenitores de la siguiente generación, denominada Generación 2 (G2).

1. Clase de alta tasa de transmisión (G2fa)

Se realizaron 8 cruzamientos f. 1B x m. 0B entre individuos de la G1fa que presentaron una $Tt_{fB} = 0,53$ y $0,48$ (Tabla 9) la progenie obtenida fue denominada G2fa. La tasa de transmisión media de cromosomas B fue $Tt_{fB} \pm E.S. = 0,53 \pm 0,03$ (Tabla 11). El rango de variación fue $0,64 - 0,41$, siendo éste rango menor al compararlo con la G1fa. En la G2fa se analizaron en total 222 individuos, de los cuales 105 presentaron 0B (47,30%), 116 individuos presentaron 1B (52,25%) y 1 individuo 2Bs (0,45%).

| Cruzamiento | Bs en G2 | | | Total | Tasa de transmisión |
|--------------|------------|------------|----------|------------|---------------------|
| | 0B | 1B | 2B | | |
| 1 | 10 | 14 | 1 | 25 | 0,64 |
| 2 | 11 | 16 | | 27 | 0,59 |
| 3 | 10 | 13 | | 23 | 0,56 |
| 4 | 14 | 18 | | 32 | 0,56 |
| 5 | 12 | 15 | | 27 | 0,55 |
| 6 | 14 | 15 | | 29 | 0,52 |
| 7 | 17 | 13 | | 30 | 0,43 |
| 8 | 17 | 12 | | 29 | 0,41 |
| Total | 105 | 116 | 1 | 222 | Tt=0,53±0.03 |

Tabla 11. Distribución del número de Bs en la G2fa.

2. Clase de baja tasa de transmisión (G2fb)

La **G2fb** fue obtenida como resultado de 9 cruzamientos f. 1B x m. 0B entre los individuos de la **G1fb** que presentaron una $Tt_{fB} = 0,28$ y $0,37$, que corresponden a los cruzamientos 12 y 8 respectivamente de la Tabla 10. La tasa de transmisión media de la **G2fb** fue: $Tt_{fB} \pm E.S. = 0,41 \pm 0,01$ (Tabla 12). El rango de variación fue menor comparado con la **G1fb** ($0,44 - 0,36$). Se analizaron en total de 272 individuos de los cuales 162 individuos presentaron 0B (59,56%), 108 individuos 1B (39,70%) y 2 individuos 2Bs (0,74%) (Tabla 12).

| Cruzamiento | Bs en G2 | | | Total | Tasa de transmisión |
|--------------|------------|------------|----------|------------|---------------------|
| | 0B | 1B | 2B | | |
| 1 | 18 | 15 | | 33 | 0,44 |
| 2 | 20 | 10 | 2 | 32 | 0,44 |
| 3 | 16 | 12 | | 28 | 0,43 |
| 4 | 16 | 12 | | 28 | 0,43 |
| 5 | 18 | 13 | | 31 | 0,42 |
| 6 | 18 | 12 | | 30 | 0,40 |
| 7 | 19 | 12 | | 31 | 0,39 |
| 8 | 19 | 12 | | 31 | 0,39 |
| 9 | 18 | 10 | | 28 | 0,36 |
| Total | 162 | 108 | 2 | 272 | Tt=0,41±0.01 |

Tabla 12. Distribución del número de Bs en la **G2fb**.

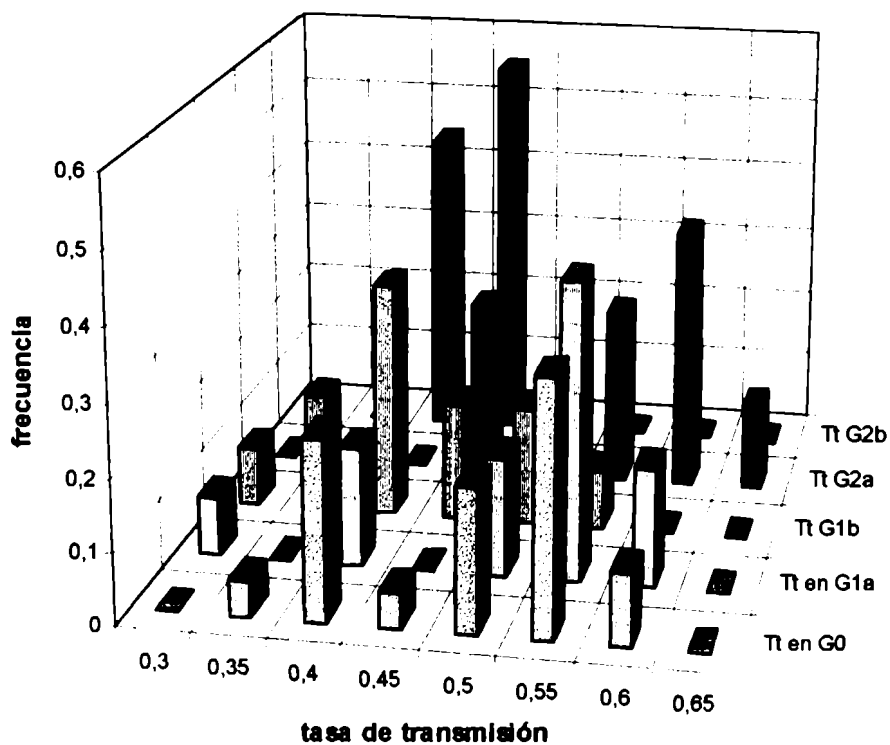


Figura 22. Tasas de transmisión de G0, G1 y G2.

El ANOVA realizado entre las tasas de transmisión media de la **G2fb** ($Tt_{fb} \pm E.S. = 0,41 \pm 0,01$) y **G2fa** ($Tt_{fb} \pm E.S. = 0,53 \pm 0,03$), indicó que difieren significativamente entre sí ($F = 20,824$; $p = 0,0004$) (Figura 22). La **G2fb** ($Tt_{fb} \pm E.S. = 0,41 \pm 0,01$) no difiere significativamente de la **G1fb** ($Tt_{fb} \pm E.S. = 0,40 \pm 0,02$) ($F = 0,007$; $p = 0,9370$) (Figura 22). De la misma manera, la **G2fa** ($Tt_{fb} \pm E.S. = 0,53 \pm 0,03$) fue comparada con la **G1fa** ($Tt_{fa} \pm E.S. = 0,48 \pm 0,02$), el ANOVA señaló que no difieren significativamente entre sí ($F = 1,689$; $p = 0,2102$) (Figura 22).

Se comparó por medio de un χ^2 (frecuencias observadas vs frecuencias esperadas) si las tasas de transmisión femenina media de cromosomas B son significativamente diferentes a la transmisión mendeliana en las dos generaciones de selección. El análisis demostró que las tasas de transmisión media altas femeninas de cromosomas B no difieren significativamente de la transmisión mendeliana mientras que, las tasas de transmisión media bajas femeninas de cromosomas B difieren significativamente de la transmisión mendeliana (Tabla 13).

| Generación | χ^2 | p | Transmisión |
|-------------------|----------------------------|------------|--------------------|
| G1fa | 0,276 | 0,599 n.s. | mendeliana |
| G1fb | 24,614 | <0,001 | no mendeliana |
| G2fa | 0,547 | 0,459 n.s. | mendeliana |
| G2fb | 10,800 | <0,001 | no-mendeliana |

Tabla 13. Análisis de la tasa de transmisión mediante un χ^2 .

DISCUSIÓN

POLIMORFISMO NUMÉRICO PARA CROMOSOMAS B EN POBLACIONES NATIVAS DE MAÍZ

Se estudió en 21 poblaciones la presencia de polimorfismo numérico para cromosomas B, el mismo fue hallado en 19 poblaciones. Se analizó en total 1120 individuos, de los cuales 428 individuos son portadores de 1-8 cromosomas B. La frecuencia media total de Bs es 38% (teniendo en cuenta las poblaciones con polimorfismo numérico para B), la población **VAV 6479** posee la máxima frecuencia media de cromosomas B encontrada (94,2%) (Tabla 2).

Longley y Kato (1965, Tabla 2d) estudiaron razas latinoamericanas de maíz y encontraron 95 plantas con Bs en un total de 1023 plantas analizadas (9,35%). Posteriormente Kato (1976, Tabla 12) estudió 94 poblaciones pertenecientes a 9 razas mexicanas de maíz encontrando un polimorfismo numérico para Bs sólo en 46 poblaciones. De un total de 531 plantas, 86 (16,2%) poseen Bs, las frecuencias medias de Bs de las poblaciones varían desde 0 - 33%.

Las frecuencias medias encontradas en las poblaciones nativas argentinas de maíz son las más altas si se compara con los escasos estudios poblacionales realizados en maíz con respecto a éste parámetro.

Polimorfismo numérico para cromosomas B - altura de cultivo

Se realizó un análisis de correlación entre la frecuencia media de cromosomas B y la altura de cultivo para determinar si éstas variables están asociadas. El análisis indicó que están correlacionadas positivamente cuando sólo se tiene en cuenta a las poblaciones con polimorfismo numérico para Bs (Figura 6). Las poblaciones cultivadas entre los 1600-3240 m presentan, en general, mayores frecuencias medias de Bs (19,6 - 94,2%) que las poblaciones cultivadas a alturas menores a los 1600 m (2-26%) (Tabla 2, Figura 4 y 6). Porter y Rayburn (1990) no encontraron una correlación significativa entre el número de Bs y altitud, los autores consideran que el reducido tamaño de la muestra (3-5 individuos por población) sería la causa de la falta de correlación. De manera similar, Bretting y Goodman (1989) analizaron los datos tomados por McClintock, Kato y Blumeschein (1981) y encuentran que el número de cromosomas B se correlaciona negativamente con la altitud. Si bien analizaron un gran número de poblaciones el número de individuos por población en algunos casos fue de 2 individuos.

Las poblaciones **VAV 6474** y **VAV 6473** constituyen una interesante excepción, porque no poseen polimorfismo numérico para cromosomas B y además son cultivadas en áreas marginales para la distribución común de maíz a 3520 y 3620 m respectivamente. En las especies *Crepis capillaris*, *Myrmeleotettix maculatus* y *Trimerotropis pallidipennis* los cromosomas B no son frecuentes en los ambientes marginales. Se postula que los Bs serían

sólo tolerados en las poblaciones que no estén bajo un estrés selectivo severo (Parker et al., 1991; Hewitt, 1973; Confalonieri, 1995).

Es muy posible, que en maíz ocurra una situación semejante y bajo condiciones severas para su cultivo, en las áreas marginales, los cromosomas B tampoco sean tolerados

TAMAÑO DEL GENOMA EN POBLACIONES NATIVAS DE MAÍZ

Contenido de ADN y Altura de cultivo

La variación hallada en el contenido de ADN medio en 17 poblaciones analizadas es del 36% (5,00 - 6,8 pg) en individuos sin Bs (es decir, en el complemento cromosómico regular, A-ADN). Esta variación es similar (38%) a la encontrada en 32 poblaciones analizadas de Estados Unidos y México (Laurie and Bennett, 1985; Rayburn, 1990; Rayburn and Auger, 1990a, 1990b; Porter and Rayburn, 1990).

En las poblaciones nativas argentinas se encontró una correlación negativa significativa entre el contenido de A-ADN y la altura de cultivo en poblaciones que se encuentran en el área de distribución del maíz (Figura 7). Otros autores han estudiado la variación del contenido de ADN total con la altitud es decir, sin discriminar la variación producida por la heterocromatina de

la causada por el polimorfismo numérico para Bs. Por ejemplo, Rayburn (1990) encontró una correlación negativa entre el contenido de ADN total y la altitud en 12 poblaciones de maíz cultivadas desde los 4900-7000 pies (1493,52 - 2133,6 m). Rayburn y Auger (1990, a) encontró una correlación negativa similar en 4 razas primitivas indígenas de México.

Estos antecedentes coinciden con los resultados obtenidos en las poblaciones argentinas de maíz (Tabla 3 y Figura 7). Sin embargo, la correlación positiva significativa comunicada por Rayburn y Auger (1990, b) en 12 poblaciones indígenas de maíz coleccionadas desde los 100 á 5300 pies (30,48 - 1615,44 m) de altura no coinciden con los encontrados por los mismos autores a mayores alturas ni con las encontradas en las poblaciones nativas argentinas de maíz; debido a que no determinaron si los individuos eran o no portadores de cromosomas B o sí el número de zonas heterocromáticas aumenta con la altitud.

La correlación negativa encontrada en las poblaciones argentinas de maíz sólo es significativa cuando se consideran las poblaciones con polimorfismo numérico para Bs. Esto indica que existe una estrecha interrelación entre el contenido de ADN de los cromosomas A y la presencia de Bs. En cada población la frecuencia de cromosomas B estaría limitada por la variación del contenido de ADN de los As y/o viceversa.

Contenido de ADN y Frecuencia poblacional de Bs

Se realizó un análisis de correlación entre el contenido de A-ADN y la frecuencia media de Bs en 17 poblaciones y se encontró una correlación negativa significativa. Se compararon además, poblaciones pertenecientes a la misma raza pero con diferentes frecuencias medias de Bs. Por ejemplo, las poblaciones **VAV 6484**, **VAV 6476** y **VAV 6451** pertenecientes a la raza **Amarillo chico** con frecuencias medias de Bs 0,20, 0,25 y 0,9 respectivamente poseen valores decrecientes de contenido de ADN (6,353; 6,280; 5,665, respectivamente, Tabla 3). Lo mismo sucede con las poblaciones de la raza **Altiplano**: **VAV 6474**, **VAV 6473** cultivadas a 3520 y 3620 m respectivamente, no poseen Bs y presentan valores mayores de contenido de ADN (6,5 pg y 6,49 pg, respectivamente) que la población restante **VAV 6167** (5,00 pg) cultivada a 3000 m y con una frecuencia media de B de 1,29 (Tabla 3).

Los resultados obtenidos sugieren que en cada raza los B serían tolerados en mayor frecuencia en aquellas poblaciones que poseen los menores tamaños de genoma en los cromosomas del complemento regular (A-ADN).

Variación del tamaño del genoma en relación a la dosis de Bs

Al estudiar el contenido de ADN total en una población se espera que los individuos portadores de Bs posean mayor contenido de ADN que los individuos sin Bs. Sin embargo, al iniciar el estudio de determinación del contenido de ADN total en las poblaciones se encontró que individuos sin Bs en algunos casos presentaban mayor contenido de ADN que individuos portadores de Bs. Por tal motivo se realizó un estudio en 4 poblaciones nativas de maíz en las cuales se determinó el contenido de ADN en individuos con distinta dosis de Bs (0-4Bs). Se encontró que, en general el contenido de ADN medio aumenta con el número de Bs. Sin embargo, éste aumento no siempre es estadísticamente significativo y proporcional a la dosis de Bs. Se encontró como caso extremo que los individuos con 1B no siempre poseen mayor contenido de ADN que los individuos sin Bs. Las poblaciones **VAV 6485** y **VAV 6475** presentan los valores extremos de contenido de ADN en individuos 0B (5,80 y 6,448 pg, respectivamente). Al considerar la relación entre éstas poblaciones cuando comparamos los individuos con 1B, la misma se invierte: 6,310 pg (**VAV 6485**) y 5,786 pg (**VAV 6475**) (Tabla 4, Figura 9). Las poblaciones **VAV 6479** y **VAV 6480** presentan valores intermedios tanto en los individuos con 0B como con 1B entre las poblaciones extremas. De acuerdo a estos resultados la relación en el contenido de ADN entre individuos 0B y 1B depende de cada población.

Si se considera el contenido de ADN medio de las distintas dosis de Bs en cada una de las 4 poblaciones se encuentra que, como ya se ha

mencionado no presentan un comportamiento similar (Tabla 4, Figura 9), indicando que las poblaciones **VAV 6475**, **VAV 6479** y **VAV 6485** presentan variación del contenido de ADN medio en individuos con diferente dosis de Bs en cambio, la población **VAV 6480** no presenta variación estadísticamente significativa en el contenido de ADN medio en las diferentes dosis de Bs. En las poblaciones **VAV 6475** y **VAV 6479** los individuos portadores de 1B se diferencian significativamente de los individuos con 3 y 4Bs, y solo en la primera (como ya se ha mencionado) de los individuos con 0B. En cambio en la población **VAV 6485** los individuos con distinta dosis de Bs no se diferencian de manera significativa entre sí (1-3B) pero si se diferencian de los individuos de 0B.

Ayonoadu y Rees (1971) estudiaron en una línea de maíz el contenido de ADN en individuos sin Bs y con 8Bs. Los autores calcularon por diferencia que cada B incrementa en un 5% el contenido de ADN. En las 4 poblaciones estudiadas el contenido de ADN de los individuos no puede predecirse incrementando un 5% por cada B adicionado. Los autores mencionados pueden estimar el incremento debido a que trabajaron con una línea endocriada y por lo tanto no posee variación en el contenido de A-ADN entre los individuos como la hallada en las poblaciones nativas argentinas de maíz. Una posible explicación de los resultados aquí obtenidos, sería la existencia de polimorfismo para secuencias de ADN repetitivo las cuales podrían enmascarar el incremento en el contenido de ADN aportado por los cromosomas B.

HETEROCROMATINA

Polimorfismo y Politipismo para Heterocromatina

La heterocromatina constitutiva es evidenciada por la técnica de bandeo C, pero no todas las bandas C son obtenidas mediante la técnica convencional sino a través de variantes de la misma. A través de las diferentes modificaciones de la técnica de bandeo C en maíz, distintos autores han observado diferentes tipos de bandas: bandas terminales o subterminales, equivalente a los nudos paquiténicos (*knobs*), bandas centroméricas, bandas en el NOR y bandas intercalares. Mayor información puede obtenerse con la utilización de fluorocromos ya que permiten caracterizar la composición de las bandas C (Sumner, 1990). No hay antecedentes en maíz de la caracterización de la heterocromatina a través de bandeo fluorescente utilizando DAPI y Cromomicina A3.

Se analizaron 11 poblaciones nativas argentinas de maíz (6 razas) que difieren respecto al contenido medio de A-ADN. Estudiando individuos con el complemento cromosómico regular ($2n=20$) se observó que los mismos presentaron polimorfismo para bandas DAPI+, es decir que dentro de cada población los individuos difieren respecto al número de bandas ricas en secuencias A+T. Este resultado explicaría, en parte, las pequeñas variaciones intrapoblacionales en el contenido de A-ADN registradas en las poblaciones.

Además, hay politipismo dado que entre poblaciones se encuentran diferencias en cuanto al número de bandas DAPI+. Por ejemplo, las poblaciones: **VAV 6167**, **VAV 6475**, **VAV 6313**, **VAV 6451**, y **VAV 6481** poseen como máximo 3, 4, 11, 12 y 14 bandas DAPI+ respectivamente (Tabla 5, Figura 15, 19 y 22).

La realización de la técnica de bandeo C en algunos de los individuos en los cuales se determinó el patrón de bandeo fluorescente (DAPI y CMA) mostró que las bandas DAPI+ y CMA+ se corresponden con las bandas C+. Sin embargo, las bandas CMA+ tiñen con una intensidad menor que las DAPI+ y en algunos casos, no se visualizan como bandas C (Figura 16, 17). También se detectaron bandas o puntos (*dot*) centroméricos a través de ésta técnica, estos últimos y las bandas detectadas con CMA no son tenidas en cuenta al realizar las relaciones entre el número de bandas y otros parámetros, porque la composición de sus secuencias son diferentes. Peacock *et al.*, (1981) determina que la secuencia altamente repetida (185 pb) aislada del genoma de maíz sólo se encuentra en los nudos paquiténicos (*knobs*) y en la región proximal en el brazo largo del cromosoma B, y no está presente en el NOR, en la heterocromatina centromérica ni el brazo distal del cromosoma B.

El análisis de la heterocromatina utilizando las técnicas de bandeo C y con fluorocromos revela que en maíz se encuentra distintas clases de heterocromatina. Por un lado la coincidencia de las bandas C+ con las bandas DAPI+ demuestran que las secuencias ricas en A -T componen la mayor parte

de las zonas heterocromáticas ,en mayor parte, en maíz (Figura 17). También se visualizó mediante bandeo C bandas o puntos centroméricos (Figura 18), pero no se tiñen de manera diferencial con los fluorocromos utilizados. Recientemente Aragón-Alcaide *et al.*, (1996) identificaron una familia de secuencias (CCS1) de los centrómeros de varios cereales (trigo, arroz, cebada, y centeno). La secuencia de las regiones centroméricas de todos los cromosomas de maíz es homóloga a la secuencia CCS1 y se denomina MCS1 (950pb). La secuencia CCS1 fue detectada en maíz en "neocentrómeros" (zonas heterocromáticas) y sólo en dos regiones centroméricas; sin embargo, estos autores no identificaron que cromosomas poseen ésta secuencia.

Como ya se ha mencionado otra clase de heterocromatina es revelada con la utilización de Cromomicina (CMA) como fluorocromo (Figura 15 y 16). El NOR de todos los individuos analizados se visualizó como una banda CMA+ evidenciando que la heterocromatina asociada al NOR o el ADNr en esa región posee secuencias ricas en G-C. En algunos organismos se ha encontrado que en el ADNr es característico la presencia de secuencias ricas en G-C, las mismas se encuentran principalmente en las secuencias 18S, 28S y además en las regiones espaciadoras (Sumner, 1990). Schweizer (1976) fue el primero en comunicar que en *Scilla siberica*, *Vicia faba* y *Ornithogalum caudatum* los NORs podían ser selectivamente diferenciados con CMA o MM (mitramicina); desde entonces se ha utilizado como método de tinción de NOR. Sin embargo, en diversos organismos la tinción con CMA no puede distinguir a los NOR de

otros segmentos heterocromáticos ricos en secuencias G-C. Por este motivo es conveniente utilizar ésta tinción conjuntamente con otros métodos específicas para NOR o en los casos en los cuales la determinación de la constricción secundaria permita corroborar los resultados (ejemplos de bandeo fluorescente con CMA y coincidencia con otros métodos: Hizume y Tanaka, 1990; Hizume, Arai y Tanaka, 1990; Hizume y Akiyama, 1992).

Los resultados obtenidos en las poblaciones de maíz utilizando bandeo fluorescente con CMA indican que las secuencias ricas en G-C son solamente identificadas en el NOR; al colorear con DAPI la constricción secundaria (ubicada en el par cromosómico 6) no presenta una tinción diferencial. Por otra parte, el NOR se visualiza como una banda muy tenue con bandeo C en las poblaciones estudiadas; Gu *et. al.* (1985) en cambio encontró en tres líneas de maíz que los NORs se tiñen más intensamente. Los resultados obtenidos indican que en el NOR de maíz se encuentran secuencias de ADN altamente repetidas con una composición diferente a los nudos paquiténicos (*knobs*) y de la heterocromatina centromérica. Mediante este método no se puede determinar si éstas secuencias corresponden a los genes (18S y 26S) o a los espaciadores que componen a las secuencias de ADN.

En los individuos portadores de cromosoma B se observó, mediante la tinción con DAPI, que éste presenta una tinción uniforme en todo el cromosoma excepto en la región proximal del centrómero que posee una banda DAPI+

(Figura 21). Esto indicaría que sólo en esta región existen secuencias ricas en A -T. También el bandeo C revela sólo en esa región una pequeña banda. Recientemente Stark *et al.* (1996) estudiaron molecularmente la estructura del cromosoma B de maíz y encontraron mediante la técnica de hibridación "in situ" (GISH) que en los cromosomas B solo una región rica en secuencias A -T no hibrida con ADN genómico de individuos 0B. Estos autores consideran que en esta región podrían estar presentes secuencias únicas que no son detectadas por la técnica de hibridación "in situ" o corresponde a heterocromatina compactada y la pérdida de hibridación se deba a un acceso restringido de la sonda de DNA. Alfenito y Birchler (1993) aislaron la secuencia pZmBs que mapea próxima al centrómero de los Bs. Además Stark *et al.* (1996) aislaron la secuencia pBGBM18.2 y ellos especulan que también podría localizarse en la región centromérica del cromosoma B. Es posible entonces que la región DAPI+ detectadas en los cromosomas B de las poblaciones nativas argentinas se corresponda con alguna de las secuencias específicas del B aislada por los autores anteriormente mencionados.

Como fue expresado en el capítulo introductorio del tamaño del genoma, la variación en el contenido de A-ADN puede explicarse, en parte, por variación en el porcentaje de heterocromatina. La correlación entre el contenido de A-ADN y número de bandas heterocromáticas no es significativa. Sin embargo existe una tendencia en la cual las poblaciones con menor número de bandas heterocromáticas poseen el menor contenido de A-ADN (Tabla 15). La

presencia de secuencias de ADN repetidas dispersas en el genoma (altamente repetidas y/o medianamente repetidas) diferentes a las zonas heterocromáticas y que no son detectadas por las técnicas de bandeo utilizadas, podrían estar involucradas en la variación del contenido de A-ADN. Hake y Walbot (1980) analizaron el patron de organización del genoma de líneas de maíz y determinaron que entre 60-80% son secuencias repetidas. Recientemente Chin et al., (1996) analizaron la presencia de microsatélites (secuencias repetidas simples) en 6 líneas de maíz. Estos autores encontraron que los microsatélites son moderadamente polimórficos (34,5%) y es muy probable que se halla subestimado la variación de alelos de microsatélites existentes porque solo se analizaron 9 líneas. Por lo tanto, es probable que la variación del número de secuencias repetidas dispersas explicarían lo hallado al comparar algunas de las poblaciones estudiadas de maíz, en las cuales la diferencia en el número y tamaño de las bandas DAPI+ no es suficiente para justificar la variación hallada en el contenido de A-ADN (Tabla 5). Por ejemplo, el número medio de bandas DAPI+ es similar entre la población **VAV 6485** (2,08) y la población **VAV 6474** (2,25) mientras que, el contenido de A-ADN difieren significativamente (5,80 y 6,514 pg, respectivamente).

Heterocromatina, Cromosomas B y Tamaño del genoma

Lorigley (1938) en poblaciones de maíz de Estados Unidos determinó la asociación entre el número de zonas heterocromáticas (visualizadas en paquitene) y la presencia de cromosomas B. Este autor encontró que los

cromosomas B son más frecuentes en plantas que poseen menos de 7 zonas heterocromáticas. Estos resultados están de acuerdo con lo hallado en las poblaciones nativas de maíz.

Como fue descrito anteriormente la presencia de cromosomas B no siempre es detectable como un incremento en el contenido de ADN comparado con individuos sin Bs. Por este motivo en las poblaciones **VAV 6485** (raza **Blanco**) y **VAV 6475** (raza **Harinoso**) se estudió la relación entre el número de cromosomas B y las regiones heterocromáticas. De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 6 y Figura 12 se concluye que la distribución en frecuencias del número de bandas heterocromáticas (0 a 2 bandas DAPI+ variables) presentes en los individuos de la población **VAV 6475** no es independiente de la presencia de cromosomas B. Es decir que en la población los individuos sin Bs presentan 0, 1 y 2 bandas DAPI+ en el brazo largo del par cromosómico 6 siendo más frecuente la presencia de una banda. Mientras que en los individuos con Bs es más frecuente la ausencia de banda en ese par cromosómico. Por otro lado, los individuos de la población **VAV 6485** no parecen tener diferencias en la distribución de bandas en relación con la presencia o ausencia de Bs (Tabla 7 y Figura 13).

El menor número de bandas DAPI+ hallado en individuos con cromosomas B en la población **VAV 6475** explicaría el menor contenido de ADN que presentan los individuos con 1B respecto a los individuos con 0B (Tabla 4,

Figura 9). El incremento del contenido de ADN debido a la presencia de cromosomas B sólo sería evidente cuando el contenido de ADN aportado por los Bs es mayor que la debida a la disminución del número de bandas heterocromáticas. En esta población, se obtuvieron los siguientes resultados: en individuos sin Bs se determinó un contenido medio de A-ADN de 6,448 pg, con un número medio de 1 banda. En individuos con 1B se determinó un contenido medio de ADN de 5,78 pg, con un número medio de 0,5 bandas; en individuos con 2Bs se determinó un contenido medio de ADN de 6,37 pg, con un número medio de 0,36 bandas y en individuos con 3Bs se determinó un contenido medio de ADN de 6.59 pg, con un número medio de 0,4 bandas. Es evidente que la disminución del contenido de ADN medio comparando los individuos de 0B con los de 1B se explica mediante la disminución del número medio de bandas. Para las dosis mayores de Bs (2 y 3Bs) el aumento del contenido de ADN medio se debe al aporte de cada cromosoma B adicionado dado que el número medio de bandas se mantiene aproximadamente constante. Se demuestra por lo tanto que la variación del número de bandas heterocromáticas enmascaran la variación en el contenido de ADN debido a la presencia de cromosomas B dado que el aumento del número de cromosomas B está asociado a una disminución del número de bandas heterocromáticas (Tabla 6, Figura 12). Además, no se puede descartar que exista al mismo tiempo, una variación de secuencias repetidas dispersas que no fueron detectadas .

Las relaciones encontradas entre los cromosomas B con el contenido de A-ADN y el número de bandas heterocromáticas, podrían explicarse según los siguientes mecanismos:

1) Rhoades *et al.* (1967), Rhoades y Dempsey (1972, 1973), basándose en datos genéticos, proponen que los Bs en maíz causarían eliminación de cromatina durante la segunda mitosis del grano de polen. Debido a que provocan no disyunción en los nudos heterocromáticos distales (*knobs*) de los cromosomas A. Como consecuencia falla la separación de las cromátidas en la zona del nudo heterocromático (*kno*b). Se forma un puente dicéntrico que al romperse se pierde el segmento portador del nudo heterocromático (*kno*b). Como resultado de ésta pérdida se forman dos células espermáticas diferentes; una sería portadora de una deficiencia de parte de un cromosoma, y la célula espermática restante presenta el complemento cromosómico completo. En el caso que el núcleo espermático deficiente fecunde a la oosfera resulta una cigota viable porque el cromosoma deficiente es estable en su transmisión. Nuestros resultados podrían ser explicados mediante este mecanismo si además postulamos que el núcleo espermático deficiente sería el portador de los dos cromosomas B (resultado de la no-disyunción).

2) Consideramos una segunda posible hipótesis que explicaría los resultados obtenidos, mediante la cual la interacción entre la heterocromatina y los Bs ocurre durante el proceso de doble fertilización (ver en Antecedentes en el gro.

Zea: Herencia de los cromosomas B en maíz). De ésta manera el contenido de heterocromatina sería un factor importante involucrado en la fertilización del núcleo espermático portador de 0B o al de 2Bs. Entonces en el caso que posea poca heterocromatina sería más probable que fecunde el núcleo espermático portador de 2Bs, y en el caso de que posea mayor contenido de heterocromatina sería más probable que sea fecundada por el núcleo espermático portador de 0B. El Lic. A. M. Chiavarino (Tesis) encontró que la tasa de transmisión masculina de cromosomas B depende de la "aceptación" o no de la célula espermática portadora de 2Bs por parte del progenitor femenino. Esto indicaría que el progenitor femenino de 0B estaría controlando el proceso de doble fertilización.

TRANSMISIÓN FEMENINA DE LOS CROMOSOMAS B

La herencia de los cromosomas B ha sido estudiada en muchas especies tanto animales como vegetales (Jones and Rees, 1982; Jones 1995), pero en muy pocas especies se ha determinado la presencia de variación en la tasa de transmisión.

El carácter analizado es el número medio de Bs por plantas en la progenie de cruzamientos f. 1B x m. 0B, por lo tanto mediante la descendencia se conoce la tasa de transmisión del progenitor materno.

Longley, (1927); Randolph, (1941) y Blackwood, (1956) analizaron las progenies obtenidas de cruzamientos en los cuales los progenitor femenino son portadores de 1B. Ellos encontraron que un cromosoma B se transmite de forma mendeliana por vía materna. El resultado del análisis de la tasa de transmisión femenina de un cromosoma B en maíz señala que, la progenie obtenida de cruzamientos f. 1B x m. 0B en el 99% de los casos es portadora de 0B y 1B (Tabla 7 - 11). Este resultado señala que el cromosoma B experimenta disyunción en la megagametogénesis. La tasa de transmisión media esperada (mendeliana) es 0,5 si el univalente B no se pierde en la meiosis y es distribuido al azar a la megaspota funcional en la megasporogénesis. La tasa de transmisión media observada coincide con la esperada en la **G₀** indicando que,

en promedio no hay una acumulación del cromosoma B en la población, es decir presenta un herencia mendeliana. Sin embargo, no todas las progenies obtenidas presentaron una tasa de transmisión mendeliana en la **G0** (Tabla 7). La variación encontrada de la tasa de transmisión de los Bs en la generación parental, **G0**, fue de 0,31 a 0,58 (Tabla 7 y Figura 22) indicando que algunas plantas tienden a perder los Bs y en otras son transmitidos mendelianamente. Este tipo de distribución continuapodría deberse a la existencia de genotipos que afectan la tasa de transmisión de los cromosomas B. Por lo tanto, para poder demostrarlo se realiza un experimento de selección divergente con cruzamientos controlados que implica seleccionar las progenies de los extremos de la distribución es decir, aquellas que mostraron las menores y las mayores tasas de transmisión de los Bs. Sí se obtiene respuesta a la selección implica que el carácter está controlado genéticamente.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con lo planteado anteriormente, pues al seleccionar las tasa de transmisión extremas de la **G0**, se obtuvo una ganancia selectiva en la primer generación (**G1**) para las progenies seleccionadas por su baja tasa de transmisión (**G1fb**). Mediante una ANOVA se demostró que, la tasa de transmisión media de la generación parental (**G0**) difiere significativamente de la generación seleccionada para baja tasa de transmisión (**G1fb**). Además, las tasas de transmisión media de las progenies seleccionadas para baja (**G1fb**) y alta (**G1fa**) transmisión difieren también significativamente entre sí, mientras que, la tasa de transmisión de la

G1fa no difiere significativamente de la **G0**. Este último resultado señala que no hay respuesta selectiva y que no es efectiva la selección para alta tasa de transmisión femenina de Bs.

Se realizó una segunda generación (**G2**) seleccionando nuevamente de cada clase las progenies que mostraron las tasas extremas. Al igual que en la generación 1, las tasas de transmisión media de la **G2fb** y **G2fa** difieren significativamente entre sí, indicando que permanecen como grupos seleccionados separados (Figura 22). Cuando se compararon cada una de las tasas de transmisión media de Bs con las tasas de transmisión media de la generación anterior (**G1**) no resultaron ser significativamente diferentes. Esto indica que toda la ganancia selectiva fue obtenida en la primer generación. Las tasas de transmisión media de la **G1fa** y **G2fa** no difieren entre sí y tampoco difieren significativamente de la tasa de transmisión media de la **G0**. Es decir que, no se seleccionó para una alta transmisión sino para una transmisión mendeliana de los cromosomas B por vía materna.

En centeno, *Secale cereale*, se estudio la variación de la tasa de transmisión femenina y masculina mediante cruzamientos f. 2B x m. 0B y f. 0B x m. 2B (Romera et al., 1991; Jiménez et al., 1995), encontrándose que existe un componente genético en la variación del número de Bs por plantas porque se obtuvo líneas de alta y baja tasa de transmisión mediante la selección masal realizada. Por otro lado, encontraron que los alelos que influyen la

transmisión de los Bs por vía materna también influyen la transmisión por la vía paterna. Recientemente Jiménez *et al.*, (en prensa) analizan la meiosis masculina de individuos con 2B y determinan que las líneas de alta y baja tasa de transmisión se diferencian en la habilidad de formar univalentes y bivalentes en metafase I lo cual determina su pérdida o conservación en el grano de polen y en el saco embrionario.

Los resultados permiten postular que en maíz sólo habría genes “**anti B**” actuando en promover la pérdida del univalente B en la meiosis femenina ó en la migración del B hacia las megasporas no funcionales o ambos. A través de nuevos experimentos se podrá determinar si los procesos antes mencionados se ven afectados en la clase de baja tasa de transmisión de cromosomas B.

Las principales conclusiones derivadas de éste estudio pueden expresarse de la siguiente manera:

→ La población (VAV 6313) de la raza Pisingallo presenta una variación para la tasa de transmisión del cromosoma B a través del progenitor femenino.

→ Mediante un experimento de selección se demostró que dicha variación está bajo control genético.

→ De ésta manera, existiría en la población un polimorfismo para genes que controlan la tasa de transmisión de cromosomas B. Es decir, genotipos que poseen genes “anti - Bs, estos genes actúan disminuyendo la tasa de transmisión de los Bs respecto a la tasa de transmisión mendeliana esperada y genotipos cuya tasa de transmisión es mendeliana.



CONCLUSIONES

1) La tasa de transmisión de cromosomas B fue estudiada en una población de la raza *Pisingallo* (VAV 6313) tanto por vía materna como paterna. El estudio de la variación de la transmisión masculina de los cromosomas B mediante cruzamientos f. 0B x m.1B fue realizado por el Lic. A.M. Chiavarino. Considerando los resultados obtenidos al analizar la transmisión femenina como masculina se determinó que en la población existen genotipos que controlan la tasa de transmisión de los cromosomas B. Es decir, genotipos que tienden a perderlos (transmisión materna) y genotipos que tienden a acumularlos (transmisión paterna). Por lo tanto, se combinaría la acción de genes "anti - B" y genes "pro - B" para el mantenimiento de un polimorfismo numérico estable de los Bs. Los mecanismos de impulso serían suficientes para explicar el mantenimiento del polimorfismo para los cromosomas B en maíz (Carlson y Roseman, 1992). Sin embargo, estos mecanismos no pueden explicar las diferencias en las frecuencias de cromosomas B en las poblaciones. Diferencias en la frecuencia de los alelos que controlan la tasa de transmisión de los cromosomas B podrían explicar la frecuencia de cromosomas B en las diferentes poblaciones (Rosato, Chiavarino, Naranjo, Puertas and Poggio, 1996).

2)

- ✓ La frecuencia de cromosomas B encontrada en las poblaciones nativas argentinas de maíz son las más elevadas si se comparan con los escasos estudios poblacionales que existen en maíz.

- ✓ Las mayores frecuencias de individuos con cromosomas B se encuentran en general, en poblaciones cultivadas a alturas superiores a los 2000 m excepto en las áreas marginales. La correlación negativa entre el número medio de Bs por planta y la altura de cultivo está estrechamente relacionado con el contenido de A-ADN.

Si se considera el contenido de ADN de individuos sin cromosomas B (es decir, en su complemento cromosómico regular, A-ADN) la variación interpoblacional es del 36%. El contenido de A-ADN se correlaciona negativamente con la altura de cultivo.

- ✓ El contenido de A-ADN está además correlacionado negativamente la frecuencia de plantas con Bs. Este resultado indica que los Bs serían mejor tolerados en mayor frecuencia en poblaciones con menor contenido de A-ADN y número de bandas heterocromáticas.

✓ Se determinó en una población (**VAV 6475**) que el número medio de bandas heterocromáticas (de los cromosomas A) presentes en los individuos con cromosomas B es menor que en individuos sin Bs. Como consecuencia, el polimorfismo para bandas heterocromáticas en las poblaciones enmascara las diferentes dosis de cromosomas B.

- ✓ Las poblaciones que presentan alta frecuencia de cromosomas B presentan en general, el menor número medio de bandas heterocromáticas. Además como

se determinó en la población **VAV 6475** los individuos portadores de Bs poseen un número medio menor de bandas heterocromáticas. Esto podría ser explicado a través de una fertilización diferencial del núcleo espermático portador de 2B frente al núcleo espermático portador de 0B dependiendo del porcentaje de heterocromatina de la oófera. Otra explicación posible sería la eliminación de cromatina en el núcleo espermático portador de cromosomas B como fue postulado por Rhoades et al., (1967).

✓ Por otro lado, la variación clinal del contenido de ADN, del número de bandas heterocromáticas (*knobs*) y la consecuente correlación inversa de la frecuencia de cromosomas B sobre un gradiente altitudinal tendría un significado adaptativo en relación a variables ambientales debido a que:

- Las poblaciones que fueron analizadas no se distribuyen sobre una transecta. Las mismas son cultivadas por el hombre desde hace mucho tiempo. Por lo tanto, no es una explicación posible que un aislamiento histórico halla ocurrido entre las poblaciones de bajo y alto contenido de A-ADN por deriva genética entre ambos extremos de un gradiente altitudinal y posterior flujo genético entre ellos.
- Patrones similares de variación son encontrados en varios grupos de poblaciones independientes distribuidas en diferentes áreas, América Central, México y Estados Unidos (Mangeldorf and Cameron, 1942;

Longley and Kato-Y, 1965; Rayburn et al. 1985; Rayburn, 1990; Rayburn and Auger 1990a). Estos patrones similares de variación clinal de contenido de A-ADN y de la frecuencia de cromosomas B es poco probable que sean resultado de la ocurrencia de procesos estocásticos.

Los resultados obtenidos indicarían que en las poblaciones existiría un límite superior para el contenido total de ADN (nucleotipo). Este "nucleotipo máximo" no sería superado debido a que existiría un balance entre la frecuencia cromosomas B, bandas heterocromáticas y secuencias de ADN repetidas dispersas. Por lo tanto, los cromosomas B serían tolerados en las poblaciones siempre que el contenido de ADN total no supere el valor óptimo.



BIBLIOGRAFIA

- Aguiar-Perecin, M.L.R. and C.G. Vosa. 1985. C-banding in maize II. Identification of somatic chromosomes. *Heredity* 54:37-42.
- Alfenito, M.R. and J.A., Birchler. 1993. Molecular characterisation of a maize B chromosome centric sequences. *Genetics* 135:589-597.
- Aragón Alcaide, L., T Miller, T. Schwarzacher, S. Reader and G. Moore. 1996. A cereal centromeric sequence. *Chromosoma* 261-268.
- Avdulov, N. 1933. On the additional chromosomes in maize. *Bulletin Applied Botany Ser.2(2):120-130.*
- Ayonoadu, U.W. and H. Rees. 1971. The effects of B-chromosomes on the nuclear phenotype in root meristems of maize. *Heredity* 27:365-383.
- Bennett., M.D. 1976. DNA amount, latitude and crop plant distribution. In *Current Chromosome Research*. Edited by Jones, K. and P.E. Brandham. Amsterdam:North Holland Publishing Company. pp. 151-158.
- -----, 1987. Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New Phytologist* 106 (Suppl.): 177-200.
- ----- and I.J. Leitch. 1995. Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. *Annals of Botany* 76 (2):113-176.
- ----- and J.B. Smith. 1976. Nuclear DNA amount in angiosperms *Proceeding Royal Society of London B* 274: 227-274.
- -----, and T.A. Kato-Y. 1965. Chromosome morphology of certain races of maize in Latin American. *International Center for the Improvement of Maize and Wheat (CIMMYT)*. Chapingo, Mexico.
- Bianchi, A., M.V. Ghatnekar, and A. Ghidoni. 1963. Knobs in Italian maize. *Chromosoma* 14:601-617.

- Blackwood, M. 1956. The inheritance of B chromosomes in *Zea mays*. *Heredity* 10: 353-366.
- Bougourd, S.M. and A.B. Plowman. 1996. The inheritance of B chromosomes in *Allium schoenoprasum* L. *Chromosome Research* 4:151-158.
- Bretting, P.K. and M.M. Goodman. 1989. Karyotypic variation in Mesoamerican races of maize and its systematic significance. *Economy Botany* 43: 107-124.
- Carlson, W. R. 1978. The B chromosome of corn. *Annuals Review of Genetics* 16: 5-23.
- -----, and R. Roseman. 1992. A new property of the maize B chromosome. *Genetics* 131: 211-223.
- -----, and Tau-San Chou. 1981. B chromosome nondisjunction in corn: Control by factors near the centromere. *Genetics* 97: 379-389.
- Cavallini A. and L. Natali. 1991. Intraspecific variation of nuclear DNA content in plant species. *Caryologia* 44:93-107.
- Cebria, A.; M.L. Navarro, and M.J. Puertas. 1994. Genetic control of B chromosome transmission in *Aegilops speltoides* (Poaceae). *American Journal of Botany* 81(11): 1502-1507.
- Chin, E.L., M.L. Senior, H. Shu and J.S.C. Smith. 1996. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. *Genome* 39(5):866-873.
- Chow, C. and E.N. Larter. 1981. Centromeric banding in maize. *Canadian Journal Genetics and Cytology* 23:255-258.

- Confalonieri, V.A. 1995. Macrogeographic patterns in B-chromosome and inversion polymorphisms of the grasshopper *Trimerotropis pallidipennis*. Genet. Sel. Evol. 27:305-311.
- Cullis, C.A. and W. Cleary. 1986. Rapidly varying DNA sequences in flax. Canadian Journal of Genetics and Cytology. 28:252-259.
- Doolittle, W.F. and C. Sapienza. 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. Nature 284: 601-603.
- Dover, G. 1980. Ignorant DNA? Nature 285:618-620.
- Dover, G. 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. Nature. 299:111-117.
- Flavell, R. 1986. Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, 312:227-242.
- Grant, W.F. 1987. Genome differentiation in higher plants. Chapter 1. In Differentiation Patterns in Higher Plants. KM Urbanska, (de). Academic Press, London and New York:9-32.
- Gu, M.G., X.A. Zhang and D.N. Huang and Y.C. Ting. 1985. Giemsa banding of mitotic chromosomes in diploid perennial teosinte, maize and their hybrids. Maydica 30:97-106.
- Hadlaczky, G.Y. and L. Kálmán. 1975. Discrimination of homologous chromosomes of maize with Giemsa staining. Heredity 35(3):371-374.

- Hake, S and V. Walbot. 1980. The genome of *Zea mays*, Its organization and homology to related grasses. *Chromosoma* 79:251-270.
- Herrera, J.A., M.D. López-León, J. Cabrero, M.W. Shaw and J.P.M. Camacho. 1996. Evidence for B chromosome drive suppression in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 76(3):633-639.
- Hewitt, G.M. 1973. Evolution and maintenance of B chromosomes. *Chromosome Today* 3:208-222.
- Hizume, M and A. Tanaka. 1990. Fluorescent chromosome bandings in two American larches, *Larix occidentalis* and *L. laricina*. *La Kromosomo II* (58):1979-1987.
- -----; M. Arai and A. Tanaka. 1990. Chromosome Bandings in the genus *Pinus* III. Fluorescent banding pattern of *P. luchensis* and its relationships among the japanese Diploxylon Pines. *Bot. Mag. Tokyo* 103: 103-111.
- -----, and M. Akiyama. 1992. Size variation of chromomycin A₃-band in chromosomes of Douglas fir, *Pseudotsuga menziesii*. *Jpn. J. Genet.* 67:425-435.
- Jackson, R.C. and K.P. Newmark. 1960. Effects of supernumerary chromosomes on production of pigment in *Haploppus gracilis*. *Science* 132:1316-1317.
- Jiménez, M.M.; F. Romera, A. Gallego and M.J. Puertas. 1995. Genetic control of the rate of transmission of rye B chromosomes. II. 0B X 2B crosses. *Heredity* 74:518-523.

- -----, -----, M. González-Sánchez and M.J. Puertas. 1995. Genes controlling rye B chromosome transmission rate are located on the Bs. *Chromosome Research*, Vol. 3, Suppl. 1:101.
- -----, -----, M. González-Sánchez and M.J. Puertas. Genetic control of the rate of transmission of rye B chromosomes. III. Male meiosis and gametogenesis. *Heredity* (en prensa).
- Johnston, J.S.; A. Jensen, D.G. Czeschin, Jr.; and J.H. Price. 1996. Environmentally induced nuclear 2C DNA content instability in *Helianthus annuus* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 83(9): 1113-1120.
- Jones, R.N. 1991. B-chromosome drive. *The American Naturalist* 137(3):430-442.
- Jones, R.N., 1995. Tansley Review No. 85. B chromosome in plants. *New Phytology* 131:411-434.
- ----- and M.J. Puertas. 1993. The B-chromosomess of rye (*Secale cereale* L.). In: Dhir KK, Saren TS, eds. *Frontiers in Plant Science Research*. Delhi (India):Bhagwati Enterprises, 81-112.
- ----- and H. Rees. 1982. *B Chromosomes*. Academic Press. N.Y.
- Kato-Y, T.A. 1976. Cytological studies of maize (*Zea mays* L.) and Teosinte (*Zea mexicana* Schrader Kuntze) in relation to their origin and evolution. *Mass Agricultural Experiment Station, Bulletin No. 635*. 185 pp.

- Laurie, D.A. and M.D. Bennett. 1985. Nuclear content in the genera **Zea** and **Sorghum**. Intergeneric, interspecific and intraspecific variation. *Heredity* 55: 307-313.
- Longley, A.E. 1938. Chromosomes of maize from North American Indians. *Journal of Agricultural Research* 56(3):177-195.
- -----, and T.A. Kato-Y. 1965. Chromosome morphology of certain races of maize in Latin American. International Center for the Improvement of Maize and Wheat (CIMMYT). Chapingo, Mexico. Research Bulletin 1: 112.
- López-León, M.D.; J. Cabrero, J.P.M. Camacho, M.I. Cano, and J.L. Santos. 1992. A widespread B chromosome polymorphism maintained without apparent drive. *Evolution* 46(2):529-539.
- Mangelsdorf, P.C., and J.W. Cameron. 1942. Western Guatemala: A secondary center of origin of cultivated maize varieties. *Botanical Museum Leaflet of Harvard University* 10:217-252.
- Mastenbroek, I., J.M.J. De Wet. 1983. Chromosome C-banding of **Zea mays** and its closest relatives. *Canadian Journal Genetics and Cytology* 25:203-209.
- Mazoti, L.B. 1987. Variaciones en los knobs de **Zea mays** L. inducidas por un plasmón de **Euchlaena mexicana** Schrader. *Mendeliana* 8(1):45-52.
- McClintock, B., T.A. Kato-Y, and A. Blumenschein. 1981. Constitución cromosómica de las razas de maíz. Su significado en la interpretación de relaciones entre las razas y variedades en las Américas. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. pp. 521.

- Mendelson, D and D. Zohary. 1972. Behaviour and transmission of supernumerary chromosomes in *Aegilops speltoides*. Heredity 29:329-339.
- Miao, V.P. S.F. Covert and H.D. VanEtten. 1991. A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. Science 254:1773-1776.
- Núñez, O. 1968. An acetic haematoxylin squash method for small chromosomes. Caryologia 21(2): 115-119.
- Nur, U and B.L.H, Brett. 1988. Genotypes affecting the condensation and transmission of heterochromatic B chromosomes in the mealybug *Pseudococcus affinis*. Chromosoma 96: 205-212.
- Oliver, J.L., F. Posse, J.M. Martinez-Zapater, A.M. Enriquez, and M. Ruiz-Rejón. 1982. B-Chromosomes and E-1 Isozyme activity in mosaic bulbs of *Scilla autumnalis* (Liliaceae). Chromosoma 85:399-403.
- Orgel, L.E. and F.H.C. Crick 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. Nature 284:604-607.
- Parker, J.S., G.H. Jones, L.A. Edgar and C. Whitehouse. 1991. The population cytogenetics of *Crepis capilaris* IV. The distribution of B-chromosomes in British populations. Heredity 66:211-218.
- -----; S. Taylor and C.C. Ainsworth. 1982. The B-chromosome system of *Hypochoeris maculata*. III. Variation in B-chromosome transmission rates. Chromosoma 85:299-310.

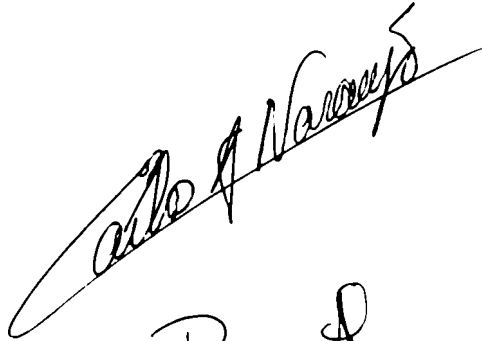
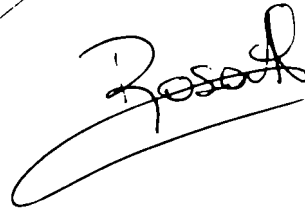
- Peacock, W.J., E.S. Dennis, M.M. Rhoades and A.J. Pryor. 1981. Highly repeated DNA sequence limited to knob heterochromatin in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 78(7):4490-4494.
- Plowman, A.B. and S.M. Bougourd. 1994. Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behaviour in *Allium schoenoprasum* L. *Heredity* 72:587-593.
- Poggio, L.; A.D. Burghardt, J.H. Hunziker. 1989. Nuclear DNA variation in diploid and polyploid taxa of *Larrea* (Zygophyllaceae). *Heredity* 63:321-328.
- -----, and J.H. Hunziker. 1986. Nuclear DNA content variation in *Bulnesia*. *The Journal of Heredity* 77:43-48.
- -----; y C.A. Naranjo. 1990. Contenido de ADN y evolución en plantas superiores. *Acad. Nac. Cs. Ex. Fís. Nat. Bs As. Monografía* 5:27-37.
- -----; Rosato, M.; and C.A. Naranjo. Meiotic behaviour and DNA content in alloplasmic lines of maize. (enviado).
- Porter, H.L. and A.L. Rayburn. 1990. B-chromosome and C-band heterochromatin variation in Arizona maize populations adapted to different altitudes. *Genome* 33: 659-662.
- Price, H.J. 1988. Nuclear DNA content variation within angiosperm species. *Evolutionary Trends in Plants*, 2(1):53-60.

- Price, H.J. and J.S. Johnston. 1996. Influence of light on DNA content of *Helianthus annuus* Linnaeus. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA). 93:11264-11267.
- Randolph, L.F. 1928. Types of supernumerary chromosomes in maize. Anatomy Research 41: 102.
- —————. 1941. Genetics characteristics of the Bs chromosomes in maize. Genetics 26:608-631.
- Rayburn, A.L. 1990. Genome size variation in Southern United States indian maize adapted to various altitudes. Evolutionary Trends in Plants 4(1): 53-57.
- ————— and J.A. Auger. 1990a. Nuclear DNA content variation in the ancient indigenous races of Mexican maize. Acta Bot. Neerl. 39(2): 197-202.
- ————— and —————. 1990b. Genome size variation in *Zea mays* ssp. *mays* adapted to different altitudes. Theoretical and Applied Genetics. 79: 470-474.
- —————, H.J. Price, J.D. Smith and J.R. Gold. 1985. C-band heterochromatin and DNA content in *Zea mays*. American Journal of Botany 72(10):1610-1617.
- Rhoades, M.M. and E. Dempsey. 1973. Chromatin elimination induced by the B chromosome of maize. Journal of Heredity 64:13-18.
- ————— and —————. 1972. On the mechanism of chromatin loss induced by the B chromosomes of maize. Genetics 71:73-96.

- -----, ----- and A. Ghidoni. 1967. Chromosome elimination in maize induced by supernumerary B chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 57:1626-1632.
- Roman, H. 1947. Mitotic nondisjunction in the case of interchanges involving of the B type chromosome in maize. *Genetics* 32: 391-409.
- -----, 1948. Directed fertilization in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 34: 36-42.
- Romera, F, M.M. Jiménez and M.J. Puertas. 1991. Genetic control of the rate of transmission of rye B chromosome. I. Effects in 2B x 0B crosses. *Heredity* 66:61-65.
- Rosato, M, A.M. Chiavarino, M.J. Puertas, C.A. Naranjo and L. Poggio, 1996. Genetic control of B chromosomes transmission rate in *Zea mays* ssp. *mays* (Poaceae). *American Journal of Botany* 83(9): 1107-1112.
- Shaw, M.W., and G.M. Hewitt. 1985. The genetic control of meiotic drive acting on the B chromosome of *Myrmeleotettix maculatus*. *Heredity* 54: 187-194.
- -----, ----- and D.A. Anderson. 1985. Polymorphism in the rates of meiotic drive acting on the B chromosome of *Myrmeleotettix maculatus*. *Heredity* 55: 61-68.
- Stark, E, I. Connerton, S.T. Bennett, S.R. Barnes, J.S. Parker and J.W. Forster. 1996. Molecular analysis of the structure of the maize B-chromosome. *Chromosome Research* 4:15-23.

- Schwarzacher, T., P. Ambros and D. Schweizer. 1980. Application of giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Systematics and Evolution* 134:293-297.
- Schweizer, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58:307-324.
- Sumner, A.T. 1990. *Chromosome banding*. London Unwin Hyman.434 pp.
- Thomas, C.A. 1971. The genetic organization of the chromosomes. *Ann Rev Genet.* 5: 237-256.
- Tito, C., L. Poggio, and C.A. Naranjo. 1991. Cytogenetics studies in the genus *Zea*. 3. DNA content and heterochromatin in species and hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* 83:58-64.
- Verma, R.S. 1988. *Heterochromatin. Molecular and structural aspects.* ed. R. S. Verma. Cambridge University Press, 301pp.
- Walbot, V. and C.A. Cullis. 1985. Rapid genomic change in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 36:367-396.
- Ward, F.J. 1980. Banding patterns in maize mitotic chromosomes. *Canadian Journal Genetics and Cytology* 22:61-67.
- Wellhausen, E.J., L.M. Roberts, X. Hernandez and P.C. Mangelsdorf. 1952. *Races of maize in Mexico: their origin, characteristics and distribution.* Bussey Institution, Harvard University.

- Wu, T-P. 1992. B-chromosomes in *Sorghum stipoides*. Heredity 68:457-463.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Wu T-P.', written over a horizontal line.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Wu T-P.', written over a horizontal line.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Wu T-P.', written over a horizontal line.