Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Afinidades genómicas y mapeo cromosómico en maíz y especies relacionadas, a través de estudios de citogenética clásica y de hibridación in situ

González, Graciela E.

2004

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 Master's and 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:
González, Graciela E.. (2004). Afinidades genómicas y mapeo cromosómico en maíz y especies relacionadas, a través de estudios de citogenética clásica y de hibridación in situ. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3708_Gonzalez

Cita tipo Chicago:
González, Graciela E.. "Afinidades genómicas y mapeo cromosómico en maíz y especies relacionadas, a través de estudios de citogenética clásica y de hibridación in situ". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3708_Gonzalez

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

AFINIDADES GENÓMICAS Y MAPEO CROMOSÓMICO EN MAÍZ Y ESPECIES RELACIONADAS, A TRAVÉS DE ESTUDIOS DE CITOGENÉTICA CLÁSICA Y DE HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Por Lic. Graciela E. Gonzalez

Directoras: Dra. Lidia Poggio y Dra. Viviana A. Confalonieri

Tesis presentada para optar por el grado de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
orientación Ciencias Biológicas

2004

№3708

A mi padre
A mi hermano
A Daniel

A mi madre, que pese a su ausencia física, me acompañó y me acompañará siempre

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lidia Poggio por haberme brindado su guía y conocimientos con la gran humildad que la caracteriza. Le agradezco especialmente su afecto y todos los maravillosos momentos compartidos. Gracias Lidia.

A la Dra. Viviana A. Confalonieri quiero agradecerle su dedicación y su ánimo, los que me otorgan confianza para seguir siempre adelante. Vivi: muchas gracias por tu constante afecto y aliento.

Al Dr. Carlos A. Naranjo quiero expresarle mi gratitud por enseñarme sus profundos conocimientos con naturalidad y humor. Por ser director de mis becas, facilitarme trabajar en el IFSC y CIGEN (UNLP-CIC-CONICET) y por su invalorable ayuda durante la realización de esta tesis. Gracias "DOC"!!!

Agradezco a mis compañeros de ruta del IFSC y CIGEN: especialmente a Ana María y Gustavo, Laura, Pablo, Eliana, Victor, Cecilia y al resto de mis compañeros por compartir mi trabajo de cada día. A Nora y Alicia, por el apoyo brindado en las tareas de campo. A Yani, por su amistad y desinteresada colaboración.

Quiero agradecer al grupo de trabajo del Departamento de Ecología, Genética y Evolución, en especial a Cecilia Comas por compartir tantos buenos momentos de trabajo, a Eduardo, a Verónica y al resto de mis compañeros y docentes por su afecto y generosidad para compartir sus conocimientos.

A mis amigos de siempre, especialmente a Fabiana, Sandra, Sonia y Andrea "gracias" por compartir los buenos y no tan buenos momentos de mi vida.

Gracias a la familia Poloni por su constante aliento y buenos deseos.

Muy especialmente agradezco a PAPI y a MAMI que con mucho esfuerzo me brindaron la oportunidad de llegar hasta este momento.

A mi hermano Damián porque siempre compartió las cosas que son importantes para mi.

A Daniel, por compartir mi camino desde hace quince años, apoyarme incondicionalmente y trabajar junto a mi para que todos mis proyectos se hagan realidad. Gracias DANI!!!

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, a la Universidad Nacional de la Plata y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por las Becas otorgadas para la realización de este trabajo de tesis.

El soporte financiero fue otorgado por: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad de Buenos Aires y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 01-06583 y 01-4443 otorgados a los Doctores Lidia Poggio y C. A. Naranjo).

INDICE

Página

RESUMEN..... 1

SUMMARY..... 3

INTRODUCCIÓN..... 5
1. El género *Zea*..... 5
1.1. Distribución..... 5
1.2. Morfología..... 6
1.3. Origen poliploide..... 7
1.4. Origen del maíz domesticado..... 8
2. Estudios de Citogenética Clásica..... 10
2.1. Estudios de regiones heterocromáticas: Bandeo C y DAPI..... 10
2.2. Estudios meióticos..... 13
Figuras 1 y 2..... 17
Tabla 1..... 19
3. Estudios de Citogenética molecular: Hibridación *in situ* (ISH)..... 20
3.1.Estudios de FISH y GISH..... 22

OBJETIVOS..... 27

MATERIALES 28

METODOS..... 29
1.Experimentos a campo..... 29
2.Análisis citogenéticos y citológicos..... 30
3.Análisis citogenético-moleculares: experimentos de Hibridación *in situ*..... 31
3.4. Obtención de las sondas clonadas en bacterias..... 35
3.5. Marcado enzimático de las sondas..... 36
3.6. Las sondas utilizadas en este estudio..... 41
3.7. Hibridación *in situ* (GISH-FISH)..... 44
4. Realización de cariotipos y láminas..... 49

RESULTADOS..... 50
1.Análisis de las afinidades genómicas entre los taxones del género *Zea* mediante estudios meióticos..... 50
Tabla 2..... 54
Figura 3 a 9..... 55
2.Análisis de las afinidades genómicas entre los taxones del género *Zea* mediante estudios citogenéticos- moleculares..... 62
2.1.Experimentos de Dot-Blot: afinidades moleculares entre especies de la Sección Luxuriantes..... 63
Tabla 3..... 63
2.2.Experimentos de GISH: análisis de las afinidades genómicas entre especies de la Sección Luxuriantes..... 63

2.3.Experimentos de GISH: análisis de las afinidades genómicas entre especies de la Sección *Zea*..... 65

Figuras 10 a 19..... 70

2.4.Experimentos de GISH: análisis de las afinidades genómicas entre especies de la sección *Zea* y la Sección Luxuriantes..... 80

Figuras 20 a la 24..... 83

3.Experimentos de FISH: mapeo físico de secuencias específicas ribosomales y de regiones heterocromáticas..... 88

Tabla 4..... 90

Figuras 25 a 28..... 93

DISCUSION..... 97

1.Comportamiento meiótico en híbridos de *Zea* con 2n=20: evidencias de aislamiento reproductivo postcigótico y de la naturaleza alotetraploide del género..... 98

2.Comportamiento meiótico en híbridos de *Zea* con 2n=30: nuevas evidencias sobre poliploidía críptica..... 102

3.Los experimentos GISH-FISH revelaron importantes divergencias genómicas en las especies y subespecies del género *Zea*..... 106

4.Acerca del origen del maíz domesticado: ¿Es *Zea mays* ssp. *parviglumis* el único progenitor de maíz moderno?..... 111

BIBLIOGRAFIA..... 114

ANEXO..... 124

RESUMEN

Este trabajo de tesis tiene por objeto realizar estudios que permitan comprender la organización y diversificación genómica de las especies y subespecies del género *Zea,* los cuales brindarán nuevos datos en relación al origen alopoliploide del complejo, a las relaciones evolutivas de sus taxones y al origen del maíz domesticado. Con este fin, se realizaron distintos estudios de citogenética clásica y de Hibridación *In Situ* Fluorescente (GISH y FISH) en especies, subespecies e híbridos intra- e interseccionales.

El análisis meiótico de los híbridos con 2n=20 cromosomas: *Zea luxurians* x *Zea diploperennis; Zea luxurians* x *Zea mays* ssp. *mays*; *Zea luxurians* x *Zea mays* ssp. *parviglumis* y *Zea luxurians* x *Zea mays* ssp. *mexicana* reveló anormalidades meióticas que explican la elevada esterilidad polínica de los mismos. Estas irregularidades pueden ser las determinantes del aislamiento reproductivo postcigótico entre las especies parentales. Por otra parte, en estos mismos híbridos se observó asincronía meiótica de dos grupos de 5 II cada uno durante diplotene-diacinesis, lo que sugiere la existencia de dos genomas ancestrales en las especies con 20 cromosomas.

El análisis meiótico de los híbridos con 2n=30: *Zea luxurians* x *Zea perennis* y *Zea mays* ssp. *mays* x *Zea perennis* mostró que la configuración más frecuente en metafase I es de 5 trivalentes + 5 bivalentes + 5 univalentes. Este resultado junto con la asincronía observada en los híbridos de 20 cromosomas dan sustento a la hipótesis que sostiene que las especies del género son alopoliploides crípticos.

El análisis GISH (Hibridación *In Situ* Fluorescente usando sondas de ADN Genómico total) en estos mismos híbridos permitió distinguir el origen genómico de las configuraciones, y reveló que los bivalentes están formados por apareamiento autosindético entre genomas homeólogos de *Zea perennis* (2n=40)

mientras que los univalentes provienen del genoma de la especie con 2n=20. Por otro lado, el mapeo FISH de genes ribosomales reveló que los mismos se encuentran localizados en los genomas parentales que presentan mayor homología.

El análisis de las afinidades genómicas mediante GISH entre especies de la sección Luxuriantes y maíz reveló que *Zea perennis* presenta una importante divergencia genómica con respecto a las otras especies. De acuerdo a los patrones de hibridación se puede postular que uno de los genomas de esta especie aloctoploide es muy divergente, ya sea porque uno de sus antecesores era diferente, o bien porque ocurrieron divergencias genómicas *a posteriori* del proceso de especiación híbrida poliploide.

Se realizaron experimentos de GISH hibridando cromosomas de maíz con sondas de ADN genómico total de las subespecies *Zea mays* ssp. *parviglumis*, *Zea mays* ssp. *mexicana* y *Zea mays* ssp. *huehuetenanguensis*. Se observó que *Zea mays* ssp. *mays* posee mucha mayor homología con *Zea mays* ssp. *mexicana* y *Zea mays* ssp. *parviglumis* que con *Zea mays* ssp. *huehuetenanguensis.* Sin embargo, mediante el uso de bloqueos genómicos, pudo revelarse que *Zea mays* ssp. *mays* y *Zea mays* ssp. *parviglumis* presentan importantes divergencias genómicas.

Una de las teorías más aceptadas actualmente en relación al origen del maíz domesticado sostiene que el teosinte anual *Zea mays* ssp. *parviglumis* sería el antecesor directo del maíz moderno, debido a que éste es el que presenta mayor afinidad genética en marcadores isoenzimáticos y moleculares. Se discute esta teoría en base a los resultados obtenidos en este trabajo, y se propone que el origen de las divergencias con su probable progenitor podría deberse a diferencias en retroelementos o a procesos de especiación híbrida que habrían ocurrido durante la domesticación del maíz.

SUMMARY

This work intends to make studies that allow understand the organization and genomic diversification of species and subspecies of the *Zea* genus, which will probably offer new insights in relation to the allopolyploid origin of the complex, to the evolutionary relationships of these taxa and to the origin of domesticated maize. With this aim, different studies applying classical and molecular cytogenetic techniques (Fluoresence *In Situ* Hibridization or FISH) in species, subspecies and hybrids were performed.

The meiotic analysis of hybrids with 2n=20 chromosomes: *Zea luxurians* x *Zea diploperennis; Zea luxurians* x *Zea mays* ssp. *mays*; *Zea luxurians* x *Zea mays* ssp. *parviglumis* and *Zea luxurians* x *Zea mays* ssp. *mexicana* revealed meiotic abnormalities that explain the high sterility of such hybrids. Postzygotic reproductive isolation between parental species may be promoted by these meiotic irregularities.

On the other hand, in these same hybrids, meiotic asyncrony of two groups of 5 bivalents each was observed during diplotene-diacinesis which suggests the existence of two ancestral genomes in the species with 20 chromosomes. The meiotic analysis of the hybrids with 2n=30: *Zea luxurians* x *Zea perennis* and *Zea mays ssp. mays* x *Zea perennis* showed that the most frequent configuration in metaphase I is of 5 trivalents + 5 bivalents + 5 univalents. This result along with asyncrony observed in the hybrids of 20 chromosomes, gives support to the hypothesis that maintains that species of the genus *Zea* are cryptic allopolyploids.

GISH analysis (Fluoresence *In Situ* Hybridization using total Genomic DNA as a probe) in these same hybrids allowed to distinguish the genomic origin of meiotic configurations, and revealed that bivalents are formed by autosyndetic pairing between homeologous genomes of *Zea perennis* (2n=40) whereas the

univalents come from the genome of the species with 2n=20. On the other hand, FISH mapping of ribosomal genes revealed that they are located in the parental genomes that display greater homology.

The analysis of the genomic affinities by means of GISH between species of the Luxuriantes section and maize revealed that *Zea perennis* shows an important genomic divergence with respect to the other species. According to the hybridization pattern observed, it was postulated that one of the genomes of this alloctoploid species is very divergent, either because one of its ancestors belonged to a different species, or because genomic divergences occurred after the process of speciation by hybridization.

GISH experiments were made hybridizing maize chromosomes with total genomic DNA probe from the three subspecies *Zea mays* ssp. *parviglumis*, *Zea mays* ssp. *mexicana* and *Zea mays* ssp. *huehuetenanguensis*. It was observed that *Zea mays* ssp. *mays* has much greater homology with *Zea mays* ssp. *mexicana* and *Zea mays* ssp. *parviglumis* than with *Zea mays* ssp. *huehuetenanguensis*. Nevertheless, by means of the use of blocking procedures, it could be revealed that *Zea mays* ssp. *mays* and *Zea mays* ssp. *parviglumis* show important genomic divergences.

One of the most accepted theories in relation to the origin of domesticated maize maintains that annual teosinte *Zea mays* ssp. *parviglumis* would be the direct progenitor of modern maize, because it displays greater genetic affinity. Taking into account the results here obtained we discuss this theory and propose that the divergences observed between maize and its putative ancestor could be either due to differences in retroelements or processes of hybrid speciation that would have happened during the domestication of modern maize.

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. El género *Zea*

Zea es una de las entidades biológicas más importantes para la alimentación humana y animal. Este género está compuesto por dos secciones (Doebley, 1990): la sección *Luxuriantes* (Doebley e Iltis), que incluye a las especies perennes *Zea diploperennis* (Doebley y Guzman), *Zea perennis* (Hitch.) (Reeves y Mangelsdorf) y a la especie anual *Zea luxurians* (Durieu y Ascherson) (Bird), y la sección *Zea* consistente en una sola especie anual *Zea mays* L. Doebley e Iltis (1980) e Iltis y Doebley (1980) reconocieron tres subespecies dentro *Zea mays*: *Zea mays* ssp. *mays* (el maíz), *Zea mays* ssp. *mexicana* y *Zea mays* ssp. *parviglumis*, esta última con dos variedades: *Zea mays* ssp. *parviglumis* var. *parviglumis* y *Zea mays* ssp. *parviglumis* var. *huehuetenanguensis*. Luego, basándose en diferencias en su constitución isoenzimática, morfológica y en su distribución geográfica, se le asignaron a estas dos variedades la categoría de subespecies (Doebley, 1990). Todos los taxones mencionados poseen 2n= 20 cromosomas excepto *Zea perennis* que posee 2n=40. Exceptuando al maíz, los demás taxones de *Zea* se agrupan bajo la denominación de "teosintes".

1.1. Distribución

Las especies y subespecies de *Zea* se encuentran en América. *Zea mays ssp. mays* posee una distribución mas amplia a lo largo de América Central y América del Sur, con una gran variabilidad ecogeográfica y diversidad de razas. Las dos especies perennes (*Zea diploperennis* y *Zea perennis*) se encuentran en regiones muy limitadas de las tierras altas del oeste de México. La especie anual *Zea luxurians* se encuentra en ambientes más ecuatoriales de Guatemala, Honduras y Nicaragua. *Zea mays* ssp. *mexicana* está restringida a las tierras altas del Plateau Central de México. *Zea mays* ssp. *parviglumis* se distribuye a lo largo

de las elevaciones medias y bajas del sur y oeste de México. La distribución de *Zea mays* ssp. *huehuetenanguensis* está limitada a una pequeña región de tierras altas en el noroeste de Guatemala (Figura 1).

1.2. Morfología

El maíz es una planta diclino monoica, de ciclo biológico anual y crecimiento determinado. Sus hojas de disposición dística e inserción alterna a lo largo de un tallo sólido son largas y angostas (su ancho es de aproximadamente una décima parte de su largo). Otra característica distintiva de esta gramínea consiste en la separación de los sexos en distintas estructuras florales en el mismo pie. A diferencia de otros pastos, los cuales producen flores perfectas, el maíz produce inflorescencias masculinas (espigas) que coronan a la planta en el ápice del tallo, e inflorescencias femeninas cubiertas por largas brácteas foliaceas (mazorcas), las cuales se ubican en el ápice de los primordios de las ramas laterales que emergen de las axilas foliares. La inflorescencia masculina es una panícula dispersa compuesta por pares de espiguillas separadas, cada una de las cuales encierra una flor fértil y otra estéril; la polinización es anemófila. La inflorescencia femenina es una espiga que produce pares de espiguillas sobre la superficie de un raquis altamente condensado. Cada una de las espiguillas femeninas encierra dos flores fértiles, pero sólo una de ellas dará origen al fruto. El fruto individual del maíz es cariópside, un fruto seco que contiene una sola semilla fusionada al pericarpio. Las mazorcas maduras constituyen una espiga de cariopses (Figura 2).

Los teosintes son plantas generalmente más bajas que las del maíz y pueden ser anuales (*Zea luxurians*, *Zea mays* ssp. *parviglumis, Zea mays* ssp. *mexicana y Zea mays* ssp. *huehuetenanguensis*) o perennes rizomatosas (*Zea perennis* y *Zea diploperennis*). Son plantas macolladoras con un sistema caulinar ramificado desde su base, siendo los tallos más finos que el de maíz. Sus hojas

son lanceoladas, de ancho variable y similares a las de maíz. Los ápices de estas ramas rematan en una inflorescencia masculina (panojas laxas) que porta espiguillas dobles. Las inflorescencias laterales, cubiertas por pequeñas brácteas foliáceas, son predominantemente femeninas pero a diferencia de maíz, pueden ser mixtas, con flores ovuladas en la base y estaminadas en el ápice. Estas espigas poseen de 6 a 9 espiguillas femeninas simples que se ubican en dos hileras sobre el raquis de la inflorescencia. Estas pequeñas mazorcas poseen un sistema de dehiscencia provisto por un raquis quebradizo. Las semillas de teosinte se encuentran encastradas en frutos con envolturas rígidas. Los componentes de estas envolturas también están presentes en el maíz, pero su desarrollo está alterado de modo tal que los cariopses no quedan encastrados como en el teosinte, sino que están expuestos sobre la mazorca. En algunos casos las semillas de teosinte pueden pasar por ciertos períodos de latencia. A diferencia del maíz, el teosinte puede multiplicarse vegetativamente (Figura 2).

1.3. Origen Poliploide

La poliploidía ha sido considerada como uno de los fenómenos más comunes en la evolución de las plantas. Se ha estimado que el 70% de las angiospermas y la mayoría de las especies de plantas con valor económico son poliploides (Soltis y Soltis, 1999). En la actualidad existen muchas evidencias que indican que *Zea mays* ssp. *mays*, es un poliploide críptico. El primero que propuso esta hipótesis fue Anderson (1945) quien consideró que el maíz podría ser un alotetraploide con 2n=4x=20 (con número básico: x=5) derivado a partir de ancestros con 2n=10.

Según Darlington (1956), la inferencia del número básico en una serie poliploide es obviamente un paso importante para proponer una hipótesis evolutiva. Algunas veces los miembros diploides de las series poliploides desaparecieron del género o incluso de la familia, borrándose de este modo la

evidencia interna de la poliploidía. Es por esto que se hace necesario estudiar otros genomas relacionados para inferir el número cromosómico básico. Los géneros relacionados al maíz como *Coix* y *Sorghum* poseen un número haploide de cinco, hecho considerado como muy sugestivo en relación al número básico x=5 propuesto para *Zea* (Darlington, 1956).

Los primeros hallazgos citológicos que apoyaron la idea que el maíz sería un poliplóide con x=5 fueron la existencia de apareamiento cromosómico durante la meiosis de haploides (McClintock, 1933; Ting, 1985), la asociación secundaria de bivalentes (Vijendra Das, 1970) y la observación de cuatro grupos de cinco cromosomas cada uno en metafases somáticas (Bennett, 1983 y 1984).

Posteriormente, Naranjo, Poggio y colaboradores realizaron numerosos estudios meióticos en especies e híbridos intra e interespecíficos del género *Zea,* que reforzaron dicha teoría y permitieron proponer que el maíz y las especies relacionadas del género son poliploides de origen antiguo (Molina y Naranjo, 1987; Naranjo *et al.*, 1990; Poggio y Naranjo, 1995).

Otros grupos de investigación también aportaron evidencias sobre el origen poliploide del maíz pero empleando metodologías muy diferentes como por ejemplo el análisis isoenzimático (Helentjaris *et al.,* 1988; Wendel *et al.,* 1986) y el estudio de grupos de ligamiento a partir de marcadores moleculares (Moore *et al.,* 1995; Gaut y Doebley, 1997). En este último caso, los mapeos comparativos y el análisis de secuencias duplicadas indicaron que el maíz sería un alopoliploide segmentario cuyos dos genomas han experimentado mutuos reordenamientos.

1.4. Origen del maíz domesticado

Si bien la naturaleza alopoliploide del maíz y de todo el género *Zea*, no está actualmente cuestionada, existe aún debate acerca del origen y las relaciones evolutivas del maíz y sus especies silvestres relacionadas. De hecho, se han propuesto muchas teorías con el objeto de explicar el origen del maíz domesticado (Beadle, 1939, 1972; Mangelsdorf y Reeves, 1938; Mangeldorf,

1947, 1974; Randolph, 1976; Goodman, 1988; Doebley, 1990; Wilkes y Goodman, 1995; entre otros).

Una de estas hipótesis propone que el maíz actual proviene de un proceso de domesticación de un teosinte anual (*Zea mays* ssp. *mexicana* o *Zea mays* ssp. *parviglumis*) (Beadle, 1939; Iltis, 1983; Doebley 1990, 1992). Existen estudios que demuestran que el teosinte anual *Zea mays* ssp. *parviglumis* es el que presentaría menor distancia genética tanto para marcadores enzimáticos (Wendel *et al.,* 1986; Doebley *et al.*, 1987; Helentjaris *et al.,* 1988; Galinat, 1988) como moleculares (Moore *et al.*, 1995; Gaut *et al.,* 1997; Matsouka *et al.*, 2002), lo que llevó a postular que sería esta subespecie quien, con mayor probabilidad, habría originado al maíz actual como resultado de un único evento de domesticación ocurrido hace 7.000 a 10.000 años (Walker *et al.*, 1998; Matsouka *et al.*, 2001).

Con el descubrimiento del teosinte perenne diploide, *Zea diploperennis* Iltis, Doebley y Guzman (Iltis *et al.*, 1979) se volvió a considerar una hipótesis tripartita propuesta por Mangeldorf (Mangelsdorf y Reeves, 1938; Mangeldorf, 1947, 1974; Wilkies, 1967), que postulaba que el teosinte anual derivaba de un cruzamiento entre *Zea diploperennis* y un maíz silvestre extinguido en la actualidad, y que el maíz domesticado proviene de subsecuentes hibridaciones introgresivas.

Eubanks (1997) realizó correlaciones entre el mapeo intergenómico con fragmentos de restricción de *Tripsacum*, que son heredados de manera estable en híbridos entre *Tripsacum* y teosinte y los cambios morfológicos en la arquitectura de la inflorescencia.. Luego, halló que la progenie recombinante de cruzamientos artificiales entre *Zea diploperennis* y *Tripsacum* era muy similar morfológicamente a los maíces más antiguos encontrados en yacimientos arqueológicos (Eubanks, 2001). Con estos estudios dio crédito a la hipótesis que postula que una hibridación entre un teosinte y *Tripsacum* habría jugado un papel fundamental en la evolución del maíz domesticado

Naranjo y colaboradores (1990) proponen que el maíz y los teosintes no derivaron unos de otros, y que su afinidad se debería a la existencia de

antecesores comunes a nivel diploide, extinguidos actualmente, por lo que los representantes modernos del género *Zea* serían producto de un complejo proceso evolutivo. Sin embargo, para corroborar las diferentes hipótesis mencionadas deberían seguir explorándose en forma exhaustiva las relaciones entre las especies de *Zea* y los géneros afines.

Uno de los objetivos mas importantes de este trabajo de tesis es el de realizar estudios que permitan comprender la organización y diversificación genómica de las especies y subespecies del género *Zea,* los cuales brindarán nuevos datos en relación al origen del maíz domesticado, al origen alopoliploide del complejo y a las relaciones evolutivas de sus taxones. Con este fin, se realizaron distintos estudios de citogenética clásica y molecular en especies, subespecies e híbridos intra- e interseccionales.

2. Estudios de Citogenética Clásica

Los análisis citogenéticos han brindado numerosos aportes al conocimiento de los mecanismos de aislamiento reproductivo y modos de especiación en plantas. La especiación híbrida es muy común en el reino vegetal, en especial la especiación por poliploidía (Grant, 1985). En estos casos la citogenética, a través del análisis genómico, ha contribuido a la resolución del origen y evolución de distintos grupos taxonómicos, por lo que ha resultado un soporte valioso para dilucidar problemas taxonómicos, evolutivos y aplicados.

2.1. Estudios de regiones heterocromáticas: Bandeo C y DAPI

En la literatura existen numerosos ejemplos de angiospermas con amplias variaciones tanto intra como interespecíficas en el tamaño del genoma (Bennett y Smith, 1976; Price, 1988; Poggio y Naranjo, 1990; Bennet y Leitch, 1995; Poggio *et al.*, 1998). Uno de estos ejemplos lo constituye el género *Zea*, ya que exhibe tanto variaciones intra como interespecíficas en el tamaño del genoma. Su valor 2C en especies con 2n=20 oscila, en líneas y razas argentinas de maíz, entre 4.9

y 6.9 pg (picogramos) y es de 8.8 pg en *Zea luxurians*. *Zea perennis* (2n=40) posee el menor contenido de ADN por genoma básico, siendo el valor 2C de tan sólo 11.5 pg (Laurie y Bennett, 1985; Tito *et al.*, 1991; Poggio *et al.*, 1998). Estas variaciones se deberían principalmente a diferencias en la heterocromatina que fueron reveladas por medio de técnicas de bandeo cromosómico C y DAPI (Tito *et al.*, 1991; Poggio *et al.*, 1998; Rosato *et al.*, 1998). Estas técnicas revelan zonas de la cromatina que presentan secuencias repetidas en *tandem*, es decir de manera contigua.

Los bandeos C y DAPI permiten realizar un análisis más preciso de la variación cariotípica ya que al identificar aquellas regiones con secuencias de ADN altamente repetidas son útiles para descubrir marcadores que identifiquen cromosomas, ó que varíen a nivel poblacional.

Los "knobs" son regiones heterocromáticas componentes de los cromosomas de maíz, de sus taxones silvestres relacionados (teosintes) y de *Tripsacum*, citológicamente observables mediante el bandeo C y DAPI. Su ubicación es característica de las diferentes líneas y poblaciones de estas especies (Kato, 1976, McClintock *et al.*, 1981). Son muy variables en número, tamaño y posición y se han encontrado correlaciones significativas entre estos polimorfismos y determinados factores ambientales, que podrían tener un significado adaptativo (Poggio *et al.*, 1998). Todas estas características los convierten en excelentes marcadores citológicos de gran utilidad en la caracterización de razas y líneas y para ser empleados en estudios evolutivos.

Numerosos autores han encontrado asociaciones entre algunos efectos genéticos y el número y tamaño de los "knobs" (Rhoades, 1942, 1978; Longley, 1945; Yu *et al.*,1997). Por ejemplo, se cree que en alguna medida todos los "knobs" afectan los niveles de recombinación en regiones particulares del complemento cromosómico, especialmente cuando se encuentran en heterocigosis. Rhoades (1978) encontró que la heterocromatina de un knob grande ubicado en heterocigosis sobre el cromosoma 10 (cromosoma "abnormal"

10, Ab10) posee la propiedad de causar la segregación preferencial de los cromosomas que poseen este "knob". En la mayoría de los maíces los "knobs" están inactivos y son conducidos detrás de los verdaderos centrómeros durante la anafase. Sin embargo, cuando está presente el cromosoma Ab10, los "knobs" se transforman en centrómeros facultativos o "neocentrómeros" que se mueven rápidamente hacia los polos sobre las fibras del huso arrastrando a los verdaderos centrómeros (Rhoades, 1978). Esta actividad neocentromérica es un ejemplo de movimiento no cinetocórico de los cromosomas durante la anafase meiótica. En maíz, esta actividad está inducida por un gen o grupo de genes ubicados sobre el cromosoma Ab10 (Yu *et al.,* 1997). La presencia del Ab10 no necesariamente afecta el rango normal de segregación cromosómica, pero propulsa a los cromosomas hacia los polos a mayor velocidad que los verdaderos centrómeros, estando esta velocidad correlacionada con el tamaño de los "knobs" (Yu *et al.*, 1997).

A nivel de secuencias se encontraron dos familias de ADN repetidos en *tandem* en la región de los "knobs": la "180-pb" y la "350-pb" también llamada TR-1. La primera consiste de un componente principal con un largo de secuencia de 180 pb y un componente menor con un largo de 202 pb derivado del de 180 pb por una duplicación de 22 pb luego de la posición 24 (Peacock *et al.*, 1981; Dennis y Peacock, 1984). La familia "180-pb" está presente en maíz, teosintes y *Tripsacum*, pero no en *Sorgo* y *Coix* (Dennis y Peacock, 1984). Los elementos TR-1 fueron descriptos por Annaniev y colaboradores (1998) quienes encontraron dos regiones de 31 pb y 12 pb que son homólogas a la secuencia "180-pb", por lo que propusieron que TR-1 habría evolucionado de la "180-pb" por duplicación y divergencia. Ambas familias se encuentran intercaladas, y pueden estar en distintas proporciones, constituyendo distintos tipos de "knobs" (Ananiev *et al.*, 1998). Recientemente, Hsu y colaboradores (2003) encontraron que la familia TR-1 está integrada por tres componentes básicos, el A (67 pb), el B (184 pb, ó 115 pb ó 108 pb) y el C (108 pb), los cuales se combinan de diversas maneras para

producir distintas unidades de repetición siempre múltiplos de 180 pb, al igual que ocurre con la otra familia "180-pb".

Si bien se conoce que el número, posición y tamaño de los "knobs" puede variar tanto intra- como interespecíficamente en maíz, teosintes y *Tripsacum*, poco se sabe sobre las variaciones en la composición de los mismos. El conocimiento de esta variación puede proveer información útil en cuanto a las relaciones filogenéticas y al origen del maíz cultivado (McClintock *et al.*, 1981; Kato y Lopez, 1990), por lo que su estudio es otro de los objetivos de este trabajo de tesis.

2.2. Estudios meióticos

Para que una especie diploide con reproducción sexual sea fértil debe poseer un comportamiento meiótico normal, o sea que debe haber un buen apareamiento entre cromosomas homólogos y consecuente formación de bivalentes (II). Ello determinará que exista buena segregación y formación de gametos balanceados y fértiles. En general el grado de apareamiento meiótico es una medida de la homología que existe entre los cromosomas. La homología genómica entre dos entidades se puede evaluar, entonces, de manera relativamente rápida y sencilla analizando el comportamiento meiótico de híbridos F1. De este modo, si el híbrido analizado es fértil y forma bivalentes de manera regular se puede concluir que hay afinidad (homología) entre los genomas parentales (Sybenga, 1975).

El grado de irregularidades meióticas será, entonces, una estima de las diferencias génicas y estructurales de las entidades en estudio. Configuraciones meióticas tales como univalentes (I), bivalentes heteromórficos o multivalentes en profase-metafase I y en estadíos posteriores (puentes y fragmentos, cromosomas con cromátidas desiguales, husos multipolares, etc.), pueden deberse a que los progenitores del híbrido difieren en distintos tipos de rearreglos estructurales, nivel de ploidía, o combinaciones génicas que afectan el apareamiento cromosómico.

Todas estas irregularidades pueden explicar la existencia de mecanismos de aislamiento reproductivo postcigótico entre los progenitores analizados.

El estudio meiótico de poliploides e híbridos entre taxones con distinto nivel de ploidía puede aportar mayor información que el realizado en híbridos diploides puesto que se puede analizar la afinidad relativa de distintos genomas en el mismo fondo genético. En estos casos la formación de multivalentes (trivalentes: III, cuadrivalentes: IV, hexavalentes: VI) es importante para establecer las relaciones entre los genomas componentes.

Desde 1987, Naranjo, Poggio, Molina y colaboradores comenzaron a analizar las configuraciones meióticas en híbridos inter e intraespecíficos del género *Zea*. Estos estudios permitieron reunir suficientes evidencias citogenéticas como para confirmar la naturaleza alopoliploide críptica del género.

Los principales hallazgos de estos estudios fueron los siguientes:

En híbridos con 2n=30 cromosomas obtenidos artificialmente (*Zea diploperennis* x *Zea perennis* y *Zea mays* ssp *mays* x *Zea perennis*) la configuración meiótica más frecuente fue: 5 III + 5 II + 5I (Molina y Naranjo, 1987; Naranjo *et al.*, 1990; Poggio y Naranjo, 1995). *Zea perennis*, con 2n=40 cromosomas presentó 5 IV + 10 II con alta frecuencia. A partir de la observación de estas configuraciones se propuso la existencia de dos genomas (a los que se llamó A y B) de 5 cromosomas cada uno, siendo AmAm BmBm y ApApApAp Bp1Bp1 Bp2Bp2 las fórmulas genómicas postuladas para maíz y *Zea perennis*, respectivamente (Tabla 1).

En especies e híbridos artificiales con 2n=20 cromosomas se observó la formación frecuente de dos grupos de 5 II cada uno en diacinesis-metafase I. La presencia de un "huso doble" fue tomada como evidencia de la existencia de dos genomas ancestrales con 10 cromosomas cada uno. Además, en alrededor del 50% de las células analizadas en algunas líneas de maíz e híbridos interespecíficos se observó una asociación secundaria de los bivalentes,

sugiriendo cierta homeología entre los postulados genomas ancestrales A y B (Molina y Naranjo, 1987; Naranjo *et al.*, 1990; Poggio y Naranjo, 1995).

Jackson y Murray (1983) demostraron que realizando tratamientos premeióticos con soluciones diluidas de colchicina se inducía el apareamiento homeólogo y la formación de multivalentes en especies que, aunque tienen origen poliploide, mostraron meiosis regular (con formación de II). Los resultados obtenidos sugirieron que éstos tratamientos pueden inducir apareamiento intergenómico, y producir el mismo efecto que el de alelos mutantes de genes que controlan el apareamiento, permitiendo la recombinación entre genomas que normalmente no lo hacen. En maíz y *Zea perennis* se realizaron tratamientos con soluciones diluidas de colchicina con la finalidad de detectar homologías crípticas entre los genomas A y B. Como resultado, el maíz tratado mostró de 1 a 5 IV en diplotene-metafase I, mientras que el maíz testigo sólo formó II. Estos resultados indican que existirían genomas homeólogos (Am y Bm) que comprenden 5 cromosomas cada uno. El tratamiento en *Zea perennis* arrojó como resultado un incremento en la frecuencia de IV, pero nunca VI u VIII, señalando que los genomas A y B no son homólogos (Poggio *et al.*, 1990) (Tabla 1).

Los tratamientos con colchicina realizados en los híbridos con 2n=30 cromosomas mostraron, sin embargo, resultados diferentes. En *Zea diploperennis* x *Zea perennis* este tratamiento provocó un aumento en la frecuencia de trivalentes (III) y nunca se observaron IV ó VI (Naranjo *et al.*, 1994) (Tabla 1). En cambio, el híbrido *Zea perennis* x *Zea mays* ssp. *mays* tratado con colchicina, no sólo mostró un aumento en el porcentaje de III sino que el 43% de las células analizadas en diacinesis-metafase I mostraron IV y VI. La ocurrencia de IV y VI en estos híbridos tratados fue coincidente con las homologías detectadas entre los genomas Am y Bm en el material tratado de maíz. La formación de estos hexavalentes constituye una fuerte evidencia a favor del hecho que el maíz y *Zea perennis* son tetraploides y octoploides crípticos, respectivamente (Poggio y Naranjo, en preparación). Además, los resultados permitieron concluir que si se

comparan los genomas Am-Bm, Ad-Bd y Ap-Bp, sólo son homeólogos los genomas Am y Bm (Poggio y Naranjo, 1995) (Tabla 1).

Estos estudios indican que los tratamientos con colchicina realizados en *Zea* alteraron el mecanismo de apareamiento homeólogo, que estaba inhibido probablemente por genes tipo *Ph* similares a los encontrados en *Triticum aestivum* (Jackson y Murray, 1983). Se concluyó entonces que estos tratamientos revelaron homeologías crípticas entre los distintos genomas del género *Zea* (Poggio *et al.,* 1990; Naranjo *et al.*, 1994; Poggio y Naranjo, en preparación).

Es interesante destacar que estudios moleculares posteriores confirmaron los resultados obtenidos por este grupo de trabajo acerca de la naturaleza alotetraploide críptica del maíz (Moore *et al.*, 1995; White y Doebley, 1998; Soltis y Soltis, 1999).

En este trabajo de tesis se llevarán a cabo estudios de citogenética clásica en híbridos intra e interseccionales de *Zea* no analizados hasta el presente, con el fin de ahondar en el conocimiento de las afinidades genómicas entre las especies progenitoras y de brindar nuevas evidencias en relación al origen alopoliploide del maíz.

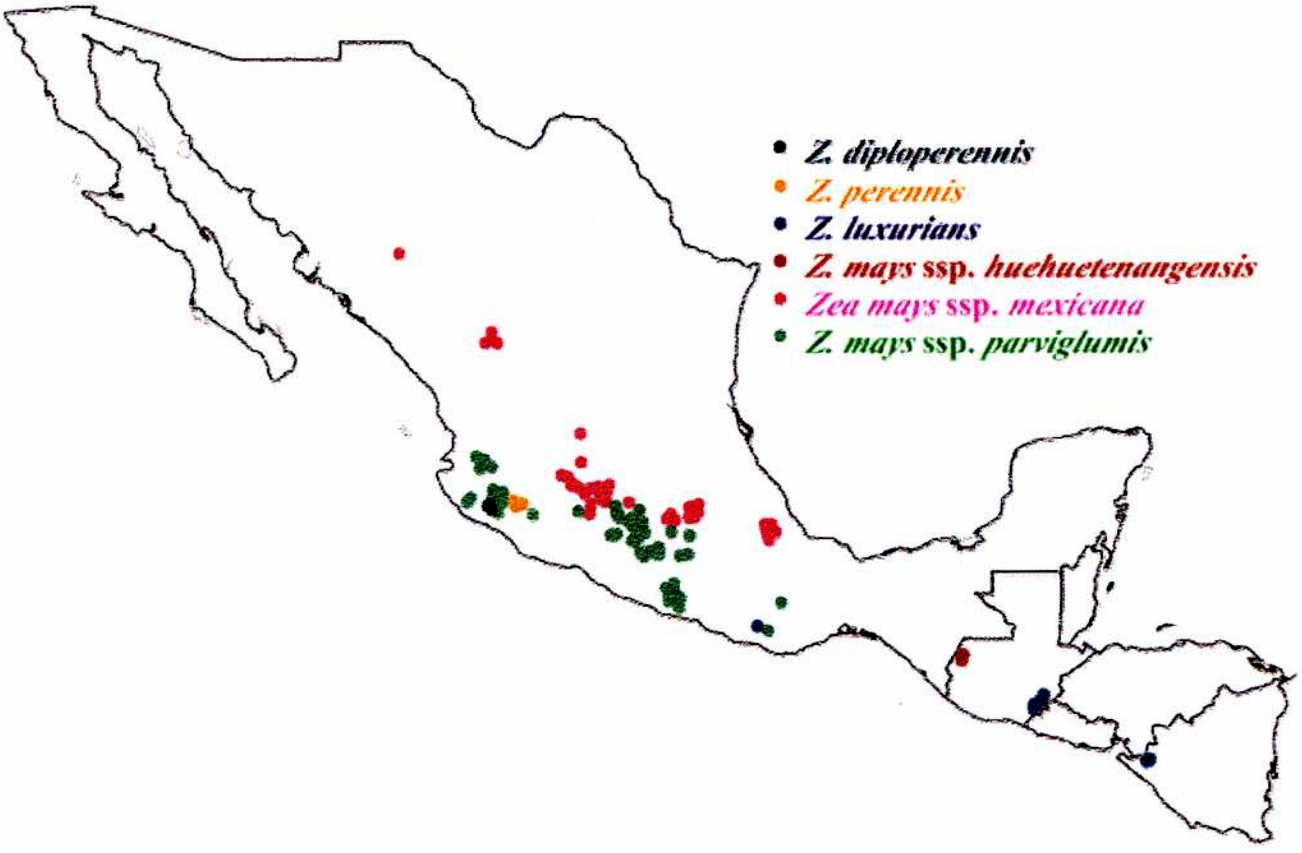


FIGURA 1: Mapa de distribución de los Teosintes

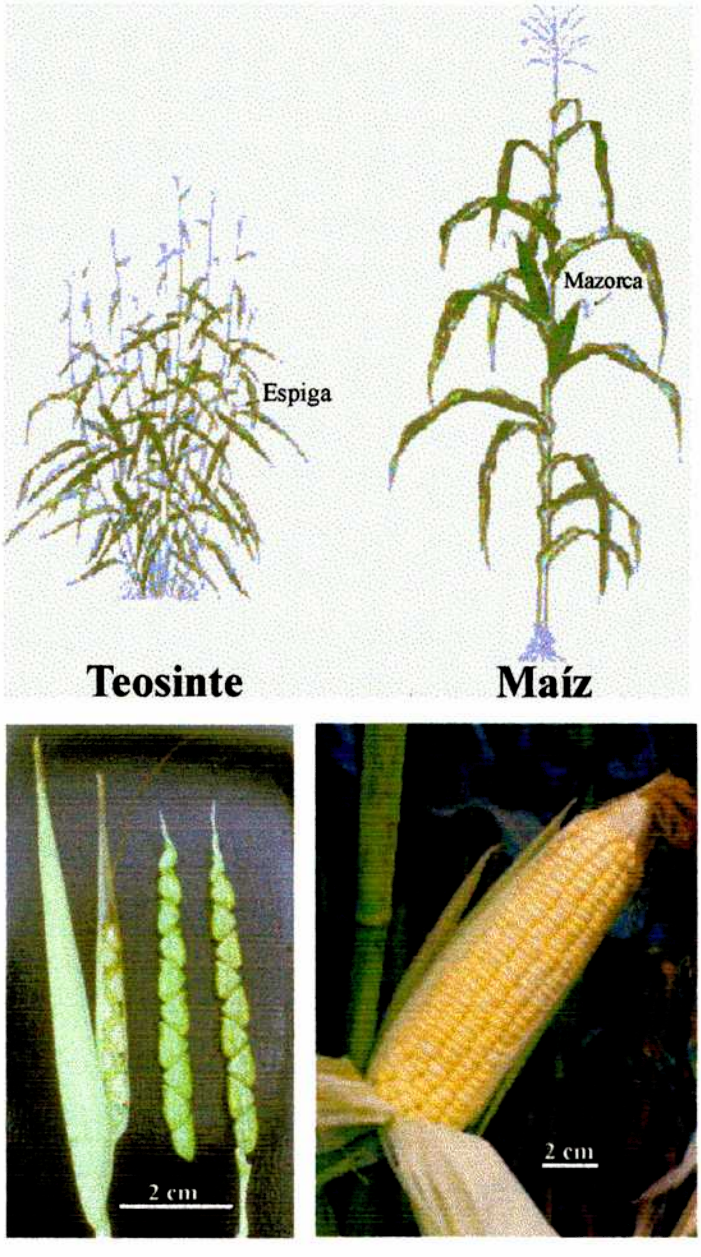


Figura 2: Arriba: Aspecto general de Teosinte (izquierda) y Maíz (derecha). Abajo: detalle de las espigas de cariopses de Teosinte y de Maíz (mazorcas)

Especies e híbridos	Genomas y configuraciones meióticas	Configuraciones meióticas (tratamientos con colchicina)
Z. mays ssp. *mays* (2n=20)[1, 2]	5II 5II A_mA_m B_mB_m	A_mA_m B_mB_m 0-5IV
Z. mays ssp. *mexicana* (2n=20)[1]	5II 5II A_xA_x B_xB_x	
Z. mays ssp. *parviglumis* (2n=20)[7]	5II 5II $A_{pa}A_{pa}$ $B_{pa}B_{pa}$	
Z. diploperennis (2n=20)[1, 2]	5II 5II A_dA_d B_dB_d	5II 5II A_dA_d B_dB_d
Z. perennis (2n=40)[1, 2]	5IV 5II 5II A_pA_p $A_p'A_p'$ $B_{p1}B_{p1}$ $B_{p2}B_{p2}$ 0-5IV	5IV A_pA_p $A_p'A_p'$ $B_{p1}B_{p1}B_{p2}B_{p2}$ IV
Z. perennis x *Z. diploperennis* (2n=30)[1, 3]	5III 5I 5II A_p A_p' A_d B_d $B_{p1}B_{p2}$ 0-5III	5III A_p A_p' A_d B_d $B_{p1}B_{p2}$ III
Z. perennis x *Z. mays* ssp. *mays* (2n=30)[4]	5III 5I 5II A_p A_p' A_m B_m $B_{p1}B_{p2}$ 0-5III	III VI III A_p A_p' A_m B_m $B_{p1}B_{p2}$ IV
Z. luxurians x *Z. perennis* (2n=30)[5]	5III 5I 5II A_p A_p' A_L B_L $B_{p1}B_{p2}$ 0-5III	
Z. luxurians x *Z. diploperennis* (2n=20)[5]	5II 3II+2I A_dA_L B_dB_L	
Z. luxurians x. *Z. mays* ssp. *mexicana* (2n=20)[6]	5II 3II+2I A_LA_x B_LB_x	
Z. luxurians x *Z.mays* ssp. *parviglumis* (2n=20)[6]	5II 3II+2I A_LA_p B_LB_p	
Z. luxurians x *Z. mays* ssp. *mays* (2n=20)[6]	5II 3II+2I A_LA_m B_LB_m	

Tabla 1: Fórmulas genómicas y configuraciones meióticas propuestas para especies e híbridos de *Zea* con y sin tratamientos con colchicina. Material no tratado: los arcos negros indican las asociaciones meióticas más frecuentes y los arcos grises indican las menos frecuentes. Material tratado: los arcos grises muestran las configuraciones meióticas que se producen luego del tratamiento con colchicina y la posible explicación de su formación. Datos tomados de: **1:** Molina y Naranjo, 1987; Naranjo *et al.*, 1990; **2:** Poggio *et al.*, 1990; **3:** Naranjo *et al.*, 1994; **4:** Poggio y Naranjo (sin publicar); **5:** Poggio *et al.*, 1999b; **6:** Gonzalez *et al.*, 2002.

3. Estudios de Citogenética molecular: Hibridación *in situ* (*ISH*)

La identificación de cromosomas individuales de un complemento cromosómico se basó, en un principio, en sus características morfológicas: largo total, relación de brazos, posición del centrómero, número y posición de los organizadores nucleolares. Luego, con la introducción de las técnicas de bandeo se pudo disponer de más herramientas diagnósticas para discriminar a los cromosomas. Sin embargo, en plantas, la estructura particular de la cromatina impidió que estas técnicas fueran exitosas en cuanto a la identificación cromosómica. El advenimiento de los protocolos de hibridación *in situ* abrió la posibilidad de observar regiones de cromatina en cromosomas individuales sobre la base de la información de las secuencias de ADN (Bennet, 1995).

El gran potencial de las técnicas de Hibridación *In Situ* (ISH) resulta de combinar la morfología nuclear o cromosómica con la información molecular de la estructura de las secuencias. Aunque estas técnicas se conocen desde 1969, época en la que se utilizaba marcación radioactiva de ADN, en plantas se comenzaron a aplicar a fines de la década del 80 debido a la gran disponibilidad de secuencias clonadas que pudieron utilizarse como sonda. Además, la posibilidad de emplear sistemas modernos de marcación y detección no radioactivos y de utilizar ADN genómico total como sonda (GISH) impulsaron el uso de esta técnica, que sin lugar a dudas complementa los resultados obtenidos por la citogenética clásica. En la actualidad existen numerosos trabajos que ejemplifican la aplicación de las técnicas de ISH para ser utilizados en diversos tipos de estudios tales como sistemáticos, filogenéticos, evolutivos, de mejoramiento y biotecnológicos. Mas aún, estas técnicas han aportado enormemente al conocimiento de la estructura, función, organización y evolución de genes y genomas (Leitch *et al.*, 1990; Bennett y Bennett, 1992; Hinnisdaels *et al.*, 1992; Kenton *et al.*, 1993; Jacobsen *et al.*, 1995; Leggett y Markland, 1995;

Benavente *et al.*, 1996 y 1998; Bejarano et al., 1996; Garriga-Calderé *et al.*, 1997; Schubert *et al.*, 1998; Poggio *et al.,* 1999 a y b, Poggio et al., 2000 a y b; Ali Mohammed *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2000; Fedak *et al.*, 2000; Raina y Rani, 2001; Gonzalez *et al*, 2004).

La hibridación *in situ* de las sondas de ácidos nucleicos sobre preparaciones cromosómicas consiste de cuatro pasos fundamentales:

1) La obtención de una sonda y su marcación.
2) La reacción de hibridación entre la sonda y el ADN blanco (cromosomas), ambos desnaturalizados previamente. Las secuencias complementarias de la sonda y del ADN de los cromosomas hibridan en relación a su homología.
3) La remoción de la sonda que no se unió o que se hibridó en forma inespecífica, por medio de lavados post-hibridación.
4) La detección y visualización de la hibridación, por medio de fluorocromos que se unen a la sonda marcada de manera inmuno-histoquímica.

La hibridación *in situ* utilizando como sonda ADN genómico total (GISH) revela homologías específicas del ADN, principalmente en lo que respecta a secuencias repetidas (Heslop-Harrison *et al.,*1988; Schwarzacher *et al.*, 1989; Bennett, 1995). El ADN repetido es el mayor componente del genoma de la mayoría de las plantas. Según su organización y su localización en los cromosomas se pueden distinguir en: a) secuencias organizadas en unidades repetidas en *tandem* (repeticiones de ADN ribosomal, ADN telomérico, micro y minisatélites, familias repetidas de ADN satélite, etc.), y b) secuencias repetidas que comprenden elementos de organización dispersa como son los retroelementos, los retroposones y las retrosecuencias. En maíz, por ejemplo, el genoma está dominado por elementos repetidos, siendo la mayoría de éstos del tipo disperso, los que ocuparían entre un 33% y un 62% del genoma (SanMiguel y Bennetzen, 1998; Meyers *et al.,*2001).

La naturaleza de las sondas utilizadas es un factor muy importante para la detección de la hibridación. Con el desarrollo de los métodos de amplificación *in situ* de las señales de hibridación y la observación de los resultados por medio de cámaras digitales, se pueden llegar a detectar secuencias de copia única (Sharma y Sharma, 2001). Las sondas pueden ser ADN genómico total extraído a partir de tejidos vegetales (GISH), o sondas cortas mediana o altamente repetidas entre las que podemos mencionar a las secuencias componentes de los "knobs" de maíz y las porciones ribosomales 5s (pTa794) y 45s (pTa71) del trigo hexaploide (Gerlach y Bedbrook, 1979).

3.1. Estudios de FISH y GISH

El FISH (Hibridación *In Situ* Fluorescente) utilizando distintos tipos de sondas cortas, de secuencia conocida o no, permite la realización de mapeos físicos e identificaciones cromosómicas. Esta identificación puede ser útil, por ejemplo, para analizar la distribución espacial de los genomas en el núcleo o para detectar la composición cromosómica remanente en generaciones segregantes de híbridos interespecíficos.

La hibridación *in situ* utilizando ADN genómico total como sonda (GISH) revela homologías específicas del ADN, principalmente en lo que respecta a secuencias repetidas (Bennett, 1995). Esta técnica puede discriminar en forma directa aquellos genomas que presentan secuencias tan divergentes de modo que no exista hibridación cruzada entre sus secuencias, aunque también permite revelar diferencias entre genomas altamente homólogos, siempre y cuando se modifiquen las condiciones de astringencia o se utilicen bloqueos genómicos.

La astringencia determina el porcentaje de nucleótidos que se aparean correctamente entre la sonda y el ADN blanco. Si la homología existente entre las especies analizadas supera el 85%, la especificidad de estos procedimientos puede ser insuficiente para discriminar entre los genomas (Schwarzacher *et al.*, 1989). Al optimizar las condiciones de astringencia se logran discriminar zonas

cromosómicas con distintas señales de hibridación, las cuales indicarían las diferencias de homología entre las secuencias de ambas especies. Es interesante destacar que, aunque hay muchos factores que afectan la astringencia, la diferenciación se logra controlando la temperatura y las condiciones iónicas de los lavados posteriores a la hibridación.

Otro método para aumentar la especificidad de la sonda genómica y lograr así una mayor discriminación entre especies muy relacionadas es la utilización de bloqueos genómicos (Anamthawat-Jonsson *et al.*, 1990). Esto significa adicionar altas concentraciones de ADN no marcado de una especie relacionada (especie B) a la especie cuyas células se van a hibridar (especie A), y utilizar como sonda el mismo ADN marcado de la especie a hibridar (especie A). Como consecuencia de esto, el ADN de la especie B de cadena simple que se encuentra en exceso, hibridará con el ADN de cadena simple de los cromosomas y de la sonda de A, dejando sin hibridar aquellos sitios cromosómicos propios de la especie A y que, por tanto, son los únicos que darán marca positiva al hibridarse con la sonda marcada de A. El bloqueo genómico no solo aumenta la diferenciación entre la especie que se usa como sonda y la que se usa como bloqueante, sino que reduce la hibridación cruzada con otras especies, ya que muchas plantas de la misma familia comparten muchas secuencias.

Las técnicas de hibridación *in situ* en plantas se aplicaron con diversos propósitos, de los cuales cabe destacar:

a) La identificación de los genomas componentes en aloploliploides:

Mediante GISH, usando como sonda el ADN genómico total de una de las especies parentales fue posible detectar o confirmar el origen alopoliploide de algunas especies de plantas. Por ejemplo, Bennett y Bennett (1992) confirmaron la naturaleza alopoliploide de *Milium montianum* y establecieron el origen de su cariotipo bimodal. También, se confirmó la naturaleza alotetraplóide de *Nicotiana*

tabacum (2n=4x=48) (Ali Mohammed *et al.*, 2000). Asimismo, el GISH se ha utilizado en el estudio de la organización genómica de especies alotetraploides y alohexaploides del género *Avena* (Leggett y Markland, 1995).

b) La localización de rearreglos estructurales en la evolución híbrida poliploide:

Luego de la formación de poliploides suele tener lugar una considerable reorganización estructural entre los genomas parentales (Soltis y Soltis, 1999). La presencia de rearreglos intergenómicos estructurales, por lo tanto, puede jugar un importante papel en la evolución y el establecimiento de híbridos artificiales y poliploides. El GISH ha sido usado con éxito para identificar varias alteraciones estructurales que tuvieron lugar entre los genomas componentes luego de la poliploidización. El primer reporte de la incidencia de translocaciones intergenómicas fue publicado en tabaco, donde Kenton y colaboradores (1993) que identificaron 9 translocaciones homocigóticas entre los genomas S y T en tres genotipos diferentes de *Nicotiana tabacum.* También pudieron detectarse adiciones cromosómicas dentro de retrocruzas de híbridos interespecíficos e inclusive verificarse rearreglos con partes del genoma hospedador, como por ejemplo de tomate en papa (Jacobsen *et al.*, 1995; Garriga-Calderé *et al.*, 1997) o de cebada en trigo (Schubert *et al.*, 1998). El primer híbrido intergenérico analizado para la identificación de sus genomas componentes fue entre *Hordeum chilense* y *Secale africanum* (Leitch *et al.*, 1990). Desde entonces, se han realizado muchos trabajos que identifican, a través de GISH, a los genomas parentales de una gran cantidad de híbridos intergenéricos.

c) El estudio del apareamiento cromosómico:

La hibridación *in situ* (FISH y GISH) provee una gran oportunidad de conocer las homologías genómicas existentes entre diferentes especies mediante el estudio del apareamiento cromosómico de sus híbridos. También puede determinarse el origen genómico de los cromosomas apareados y desapareados

(Benavente *et al.*, 1996, 1998; Cao *et al.*, 2000), estableciéndose la naturaleza auto o alosindética de estos apareamientos. Asimismo, el GISH demostró ser una herramienta muy útil cuando se trata de analizar los dominios cromosómicos en núcleos interfásicos y la dinámica del apareamiento durante determinados estados de la meiosis, donde los cromosomas no pueden ser identificados por métodos clásicos (Garriga-Calderé *et al.*, 1997).

d) La caracterización de híbridos somáticos:

La hibridación somática es la principal técnica disponible para generar híbridos entre especies de plantas genéticamente distantes. Esta metodología ha abierto nuevas perspectivas para la introgresión de características agronómicas útiles en algunos cultivos. El GISH se ha utilizado para discriminar entre los diferentes genomas que componen a los híbridos somáticos y caracterizar las aberraciones cromosómicas que puedan ocurrir durante la formación de estos híbridos y/o de sus progenies. Con esta técnica fue posible diferenciar a los genomas componentes, y detectar la presencia de translocaciones en híbridos obtenidos por fusión de protoplastos en *Nicotiana plumbaginifolia* y *Petunia hybrida* (Hinnisdaels *et al.*, 1992).

e) La detección de cromatina o genes transferidos, entre distintos taxones durante procesos de hibridación introgresiva:

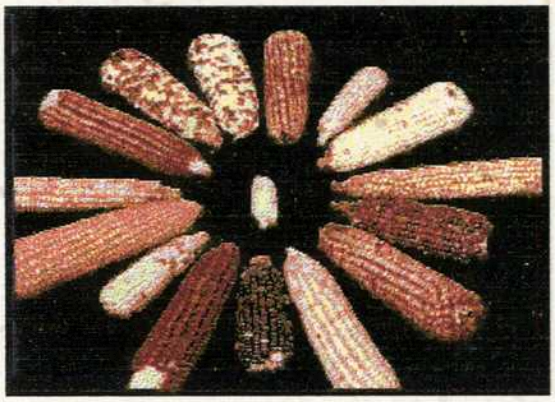
La hibridación introgresiva, en la que genes útiles provenientes de otras especies son incorporados a especies cultivadas, es una de las estrategias más exitosas en el mejoramiento. La introgresión de genes extraños en especies de importancia económica generalmente requiere hibridación con especies y/o géneros distantes genéticamente. El FISH y el GISH han sido utilizados para monitorear el camino de la cromatina introgresante a través de subsecuentes generaciones especialmente en aquellos casos en donde los análisis citogenéticos tradicionales son insuficientes (Jacobsen *et al.*, 1995). Además, se

pudieron demostrar introgresiones relativamente pequeñas de cromatina extraña como por ejemplo de centeno en trigo (Fedak *et al.*, 2000).

f) La localización física y genómica de loci transgénicos:

Algunos trabajos han comenzado en esta dirección y se han utilizado las técnicas de FISH y GISH en forma combinada para determinar el sitio de integración en el cromosoma de un locus transgénico en los genomas del tabaco alopoliploide. En este estudio, mientras que el FISH reveló el sitio de integración del transgen, el GISH indicó a qué genoma pertenecía (S o T) el cromosoma que contenía el transgen (Bejarano *et al.*, 1996).

En este trabajo de tesis se presentan los estudios de GISH y FISH realizados en especies, subespecies e híbridos de *Zea,* con el fin de: analizar el origen genómico de las distintas configuraciones meióticas de híbridos, revelar las afinidades genómicas entre las distintas especies y subespecies, detectar los genomas componentes de estos alopoliploides crípticos, y, por último, analizar la composición, número y localización de secuencias ribosomales y secuencias "knobs".



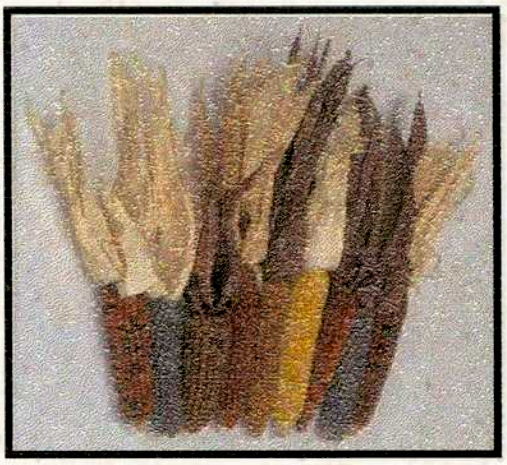
Objetivos

OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este trabajo de tesis es el de realizar estudios que permitan comprender la organización y diversificación genómica de las especies y subespecies del género *Zea,* los cuales brindarán nuevos datos en relación al origen del maíz domesticado, al origen alopoliploide del complejo y a las relaciones evolutivas de sus taxones. Con este fin, se realizaron distintos estudios de citogenética clásica y molecular en especies, subespecies e híbridos intra e interseccionales.

Objetivos particulares

1) Realizar estudios de citogenética clásica en híbridos intra e interseccionales de *Zea* no analizados hasta el presente, con el fin de ahondar en el conocimiento de las afinidades genómicas entre las especies progenitoras y de brindar nuevas evidencias en relación al origen alopoliploide del maíz.
2) Realizar estudios de citogenética molecular utilizando sondas de ADN genómico total (GISH) en especies, subespecies e híbridos de *Zea,* con el fin de:
   - Identificar los genomas componentes de estos alopoliploides crípticos.
   - Analizar el origen genómico de las distintas configuraciones meióticas de híbridos.
   - Analizar las afinidades genómicas entre las distintas especies y subespecies y relacionar estos resultados con las hipótesis planteadas acerca de la evolución del género y el origen del maíz domesticado.
3) Realizar estudios de citogenética molecular utilizando sondas específicas (FISH) en especies, subespecies e híbridos de *Zea,* con el fin de:
   - Realizar un mapeo físico de secuencias ribosomales.
   - Realizar un mapeo físico de secuencias "knobs" y analizar las variaciones en sus composiciones.



Materiales y Métodos

MATERIALES

Sección Luxuriantes

- *Zea perennis* proviene de Ciudad Guzmán, Jalisco, México. Legado por la Dra. Prywed.
- *Zea diploperennis* procede de las Sierras Occidentales de Mananthan, a 2 km de Las Joyas, Jalisco, México. Legado por Rafael Guzman y M. A. Guzman.
- *Zea luxurians* proviene de Guadalajara, México. Cultivar 2228 del Instituto Fitotécnico Santa Catalina (IFSC) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata (FCAyF-UNLP).

Sección Zea

- *Zea mays* ssp. *mexicana* (Razas Nobogame y Monte Central). Cedidos por el CIMMYT (Centro de Investigaciones de Maíz y Trigo, México).
- *Zea mays* ssp. *parviglumis* (Loc. Balsas, cultivar 6836 del IFSC). Cedido por el CIMMYT.
- *Zea mays* ssp. *huehueteranguensis* (Loc. Huehuetenango). Cedido por el CIMMYT.
- *Zea mays* ssp. *mays*. Se utilizaron varias razas nativas del noroeste argentino y líneas endocriadas pertenecientes al IFSC. Las razas utilizadas fueron Amarillo Chico (VAV 6451 y 6484) y Orgullo Cuarentón (VAV 6482), obtenidas en los bancos de semillas del laboratorio Vavilov de la Facultad de Agronomía (UBA) y del IFSC. Las líneas empleadas fueron: Knobles, Pisingallo, Gaspé, 13043 y WXEB pertenecientes al IFSC.

MÉTODOS

1. Experimentos a campo

- Se sembraron los materiales a campo y en invernáculos y se realizaron los cruzamientos intra e interespecíficos en forma artificial. Para ello se aislaron las espigas femeninas, antes de la emergencia de los estigmas, cubriéndolas con bolsas de cruzamiento siliconadas. Cuando los estigmas maduraron se polinizaron rápidamente con el polen maduro del progenitor masculino deseado. Luego se volvieron a cubrir las espigas femeninas para evitar la libre polinización. En el caso de los teosintes que poseen espigas laterales mixtas, se debieron escindir las flores masculinas de las mismas previamente a la emergencia de los estigmas con el objeto de evitar la autopolinización dentro de la bolsa de cruzamiento.

- Del mismo modo se realizaron autofecundaciones de las líneas y razas de maíz utilizadas en estos estudios, así como también de los teosintes.

- Se cortaron hojas jóvenes de todas las especies sembradas para su utilización en la extracción de su ADN genómico total.

- Cuando las plantas adultas de las especies e híbridos comenzaron a generar sus inflorescencias masculinas, éstas fueron cortadas y fijadas en una proporción 3:1 de alcohol etílico ácido acético glacial. Estas panojas se almacenaron a 4°C para ser utilizadas luego en los estudios meióticos.

- Se cosecharon, secaron y desinfectaron las semillas obtenidas y se almacenaron en oscuridad y a 4°C dentro de sobres de papel.

2. Análisis citogenéticos y citológicos

2.1. Preparaciones citológicas

- Para estudios mitóticos se pusieron a germinar las semillas en cápsulas de Petri estériles conteniendo papel de filtro embebido en agua destilada que se llevaron a cámara de cultivo con luz y temperatura controladas.
- Los ápices radiculares se pretrataron en 8-hidroxiquinolina (0.02M) a temperatura ambiente durante 3 horas.
- Luego se lavan en agua destilada 3 veces durante 10 minutos cada una y se fijaron en una proporción 3:1 de alcohol etílico : ácido acético por 24 – 48 horas a 4°C.
- Para realizar las preparaciones cromosómicas las raíces fijadas se lavaron en buffer Mc Ilvaine (ácido cítrico de sodio al 0.01 M, pH 4.6, ver anexo) para remover el fijador.
- Se trataron con una solución enzimática conteniendo 2% de celulasa (Onozuka R10, Merck) y 20% de pectinasa líquida (Sigma P4716) a 37°C durante 30 minutos.
- Se lavaron nuevamente en buffer Mc Ilvaine y se realizó el aplastado del material sobre una gota de ácido acético (45%) sobre un portaobjetos.
- Las preparaciones que contenían buenas células prometafásicas y metafásicas se seleccionaron mediante un microscopio de contraste de fase.
- Se removió el cubreobjetos mediante congelamiento del cubreobjetos en hielo seco o con nieve carbónica.
- Las preparaciones se secaron al aire para ser utilizadas en procedimientos de bandeo o hibridación *in situ.*
- Este método se utilizó también para la realización de las preparaciones meióticas de anteras inmaduras, que luego fueron utilizadas en experimentos de hibridación *in situ* (GISH-FISH).

2.2. Tinción con hematoxilina acética:

Para realizar los estudios meióticos se separaron las anteras de las flores masculinas fijadas en alcohol etílico: ácido acético glacial (3:1).

Se aplastaron las anteras sobre un portaobjetos al cual se le colocó una gota del colorante hematoxilina acética al 2% (ver anexo).

A través de un tubo capilar se agregó una microgota de Citrato Férrico que actúa como mordiente (ver anexo).

Se cubrió con un cubreobjetos y se analizó en microscopio óptico de luz directa.

Las microfotografías se obtuvieron con película fotográfica Kodak T-Max blanco y negro de 400 asas de sensibilidad.

3. Análisis citogenético-moleculares: experimentos de Hibridación *in situ*

3.1. Tipos de sondas:

Las sondas que se utilizan en hibridación *in situ* pueden ser:

- Sondas de ADN genómico total que se extrae y purifica a partir de tejidos vegetales y que son utilizadas en la técnica de GISH en forma individual o combinada en experimentos de McGISH (Hibridación *In Situ* Genómica multicolor).
- Sondas cortas de secuencia conocida o desconocida, que pueden ser obtenidas y amplificadas: **a)** por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando cebadores adecuados y distintos ADNs como molde y **b)** por clonación en plásmidos y amplificación en bacterias. Entre ellas podemos mencionar a las sondas generadas por PCR a partir de las secuencias repetidas de 180 pb y 350 pb componentes de las bandas "knob" heterocromáticas de maíz y sus especies silvestres relacionadas; las porciones ribosomales del trigo hexaploide y regiones repetidas de

otros cereales, como por ejemplo las sondas pTa794 (5s) y pTa71 (45s); sondas generadas a partir de productos RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA); sondas de genes de secuencia única; etc. Todas esta sondas se utilizan con el objeto de realizar mapeos físicos y encontrar marcadores cromosómicos.

3.2. Obtención de las sondas: Extracción de ADN genómico total

El ADN genómico total se utilizó como sonda o como bloquente específico en los experimentos de GISH, en experimentos de Dot-Blot y como molde para la amplificación de secuencias de ADN mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Para estos trabajos el ADN genómico se extrajo a partir de hojas jóvenes siguiendo el protocolo de Maniatis *et al.* (1982), con algunas modificaciones, el que se detalla a continuación:

Primera fase de extracción y purificación:

- En ADN genómico total se extrajo a partir de 1 gr de hoja fresca o de 0.5 gr de material seco.

  Se pulverizaron las hojas en un mortero con nitrógeno líquido.

  El polvo obtenido se pasó a tubos de centrífuga de polipropileno estériles (resistentes a fenol) sobre hielo.
- Se añadieron 10 ml de tampón de lisis (ver anexo) y se incubaron a 50°C durante 1 hora.
- Se agregó a cada tubo un volumen de fenol-cloroformo/isoamílico (25-24/1, ver anexo). Se mezcló y se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos.

  Se pasó la fase acuosa con ADN a tubos nuevos donde se colocó nuevamente un volumen de fenol-cloroformo/isoamílico (25-24/1) y se repitió el paso de centrifugación.

Estos últimos pasos son necesarios para separar las proteínas y restos vegetales del ADN que luego se precipita y purifica nuevamente en una segunda etapa.

- Se tomó el sobrenadante y se pasó a pequeños vasos de precipitado estériles, sobre hielo, y se le añadieon dos volúmenes de alcohol etílico absoluto a -20°C.

  El ADN que precipitó se extrajo enrollándolo en una pipeta Pasteur estéril y se pasó a microtubos tipo "eppendorf" estériles, sobre hielo.
- Se agregó a los tubos alcohol absoluto a –20°C y acetato de sodio 3M (pH5.2).

  Se centrifugó en ultramicrocentrífuga a 10.000 rpm durante 10 minutos.

  Se eliminó el sobrenadante. El ADN queda sobre las paredes del tubo. Se lo lavó con alcohol etílico 70° frío y se lo centrifugó brevemente. Se descartó el alcohol y se repitió la operación.

  Se dejó secar durante 1 ó 2 horas y se resuspendió el ADN extraído en 200 a 500 ul de buffer TE (10 mM de Tris-HCl + 1 mM de EDTA, pH8, ver anexo) y se lo dejó disolver toda la noche a 5°C.

<u>Segunda fase de extracción y purificación</u>:

- Se agregó RNAsa libre de DNAsa al ADN disuelto en TE a una concentración final de 100 mg/ml e incubó durante 20 minutos a 37°C.
- Se añadió una solución fresca de SDS 10% más 2.5 ul de Proteinasa K (10 ug/ml) y se incubó a 50°C durante 1 hora.
- Se agregó un volumen de fenol-cloroformo/isoamílico (25-24/1). Se mezcló y centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos.

  Se tomó el sobrenadante y se colocó en otro tubo tipo "eppendorf" estéril sobre hielo. Si era necesario se repetía este paso.

  El ADN se precipitó con alcohol etílico absoluto a –20°C centrifugando brevemente y se eliminó el alcohol.

Se lavó el precipitado con alcohol etílico 70% frío y se volvió a centrifugar brevemente. Esta operación se repitió dos veces más.

Se dejó secar el ADN precipitado durante 1 ó 2 horas a temperatura ambiente.

Luego se resuspendió en 200 a 500 ul de buffer TE (ver anexo) dependiendo de la cantidad extraída.

Se determinó la concentración del ADN extraído por medio de electroforesis en gel de agarosa (ver siguiente punto).

Se guardó a –20°C para sus múltiples usos posteriores.

3.2.1. Estimación de la concentración del ADN extraído por electroforesis en gel de agarosa:

- Se preparó un gel de agarosa al 0.8% con 2 gr de agarosa ultra pura, 10 ml de buffer TAE 10 X (Tris-HCl 0.04M, EDTA disódico 0.001M y 11.4 ml de ácido acético, ver anexo) y 225 ml de agua destilada estéril. Se hirvió la solución durante 1 minuto y se enfrió hasta los 60°C.

  Se añadieron 12 ul de Bromuro de Ethidio que tiñe el ADN para su detección con luz ultravioleta.
- Se volcó en el molde de la cuba electroforética conteniendo un "peine" y se deja solidificar. Se sumergió el gel en la cuba que contiene buffer TAE 1 X (ver anexo) y se retira el peine.

  Las mezclas de siembra se prepararon con 5 ul del ADN incógnita, 2 ul de buffer de siembra (ver anexo) y 3 ul de agua destilada estéril. Se preparó además una mezcla de siembra conteniendo el ADN del marcador de peso molecular (fago Lamda digerido con EcoRI/Hind III).
- Se sembró cada mezcla de ADN con micropipeta en cada pocillo del gel.

  Se conectaron los electrodos a la fuente de poder y se dejó correr el ADN durante 2 horas.

- Se colocó el gel sobre un transiluminador de luz ultravioleta para visualizar las bandas obtenidas y compararlas con las del marcador de peso molecular. De este modo se determinó la concentración de cada una de las muestras.

3.3. Obtención de las sondas generadas por PCR

Algunas de las sondas de ADN repetido utilizadas en este trabajo de tesis fueron obtenidas mediante amplificación por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa. Esta técnica permite que secuencias de ADN de hasta 4 kb (kilobases) puedan ser amplificadas en forma directa y específica, utilizando como templado o molde a secuencias de ADN clonadas y ADN genómico total, a partir de cebadores específicos que limitan la secuencia de interés. El proceso de amplificación se realiza en un termociclador. La reacción emplea una enzima ADN polimerasa, llamada *Taq* polimerasa que es aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*, así como también una mezcla de nucleótidos (DNTPs). Los detalles de la metodología de PCR aplicada en este trabajo de tesis se describen en el item 3.6.2.1 de métodos.

3.4. Obtención de las sondas clonadas en bacterias

3.4.1. Preparación del medio de cultivo para *Echerichia coli*

El medio de cultivo (LB) se compone de Tripteína (10 gr/l), Extracto de Levadura (5 gr/l), Cloruro de Sodio (10 gr/l) y agua destilada, pH 7.

- Se autoclavó y se le agregó un antibiótico que dependía de la resistencia que poseían las bacterias a multiplicar: ampicilina (20 mg/ml) o cloranfenicol (75 ug/ml).

Las colonias a multiplicar se repicaron en los tubos de ensayo con medio LB y se permitió el crecimiento bacteriano en un baño térmico con movimiento rotatorio a 37°C durante toda una noche.

Para mantener las bacterias conteniendo el inserto de interés, éstas se sembraron en cajas de Petri conteniendo el medio de cultivo LB con agar-agar en una concentración de 20 gr/l.

Para estas bacterias por más tiempo (2 a 3 años), se realizan "Stabs", para lo cual se colocaban 500 ul de una mezcla 70:30 de medio LB : glicerol tindalizado (ver anexo) en un tubo "eppendorf" estéril y se le agregaban 500 ul del cultivo crecido en los tubos de ensayo. Los "Stabs" se almacenaron en freezer a -70°C.

Todos los procedimientos de siembra y repique de bacterias se realizaron en condiciones estrictas de esterilidad, bajo un campo de flujo laminar irradiado previamente con luz ultravioleta.

3.4.2. Extracción del ADN plasmídico (Miniprep):

Este procedimiento consiste en la purificación del inserto plasmídico a partir de un cultivo bacteriano. Se realizó mediante el uso de "kits" comerciales (Quia-Prep Kit , QuiaGen, Promega), según instrucciones del fabricante.

Una vez obtenidos los plásmidos, se separó la secuencia de interés utilizando distintas enzimas de restricción. Para esto se colocaron 5 unidades de enzima por ug de ADN plasmídico a cortar, el buffer de la enzima, el ADN plasmídico y agua destilada estéril hasta llegar a un volumen de 50 ul. La preparación se incubó luego a 37°C durante toda una noche y finalmente la reacción se frenó colocando los tubos a 4°C.

Los resultados se analizaron y cuantificaron por electroforesis, sembrando 3 ul de la solución obtenida en un gel de agarosa al 0.8%.

3.5. Marcado enzimático de las sondas:

La marcación del ADN deben realizarse sobre fragmentos menores de 1000 pb. Por ello es que las moléculas largas que en general se extraen de tejidos deben degradarse. Esto se logra "vortexeando" el ADN por 3 a 5 minutos o pasándolo reiteradas veces a través de agujas muy finas.

Durante el proceso de marcado enzimático no radioactivo se pueden incorporar marcas dentro del ADN a través de distintos sistemas enzimáticos como el "Nick Traslation" o el "Oligolabelling o Random Primed Labelling". Mediante estos sistemas se sintetizan ácidos nucleicos utilizando nucleótidos modificados (marcados).

Las marcas utilizadas comúnmente son la biotina (vitamina H) y la digoxigenina (esteroide). Estas marcas se detectan por métodos inmuno-histoquímicos.

3.5.1. Tipos de marcado enzimático

Estos métodos pueden dividirse en aquellos de marcado uniforme (Nick Traslation y Oligolabelling) y los de marcado terminal de la secuencia (End Labelling). Los primeros son los más utilizados pues incorporan mayor cantidad de marca al ADN. Sin embargo, las sondas marcadas por End Labelling pueden ser más sensibles puesto que se reduce el efecto del impedimento estérico entre la sonda y el ADN blanco.

A continuación se describen algunos de ellos, los cuales se utilizaron en este trabajo de tesis.

3.5.1.1. Nick Traslation:

Para marcar el ADN se siguieron los procedimientos indicados por los fabricantes de los "kits" de marcado, por ejemplo el Nick-Translation System (Gibco BRL, Nº 8160SB), que contiene todos los elementos necesarios. Separadamente se deben adquirir los nucleótidos marcados con biotina, con digoxigenina, etc.

La reacción utiliza dos enzimas (DNAsa I y Polimerasa I) para incorporar los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) marcados y no marcados en la doble cadena.

- La DNAsa introduce una ruptura ("nick") en una de las cadenas lo que expone un grupo 3'-OH libre.

- La actividad exonucleasa 5'-3'de la DNA Polimerasa I remueve los nucleótidos en el lado 5'de la ruptura o "nick".

- La enzima DNA Polimerasa cataliza la incorporación de nuevos dNTPs de la solución en el extremo 3'-OH del "nick".

Las actividades combinadas de las exonucleasas y las polimerasas dan como resultado la síntesis de una nueva hebra de ADN en dirección 5'-3', ya que algunos de los dNTPs de la solución estaban marcados, esta nueva hebra también lo estará.

3.5.1.2. Oligolabelling:

La reacción utiliza el fragmento "klenow" de la enzima DNA polimerasa de *Echerichia coli* y oligonucleótidos al azar para incorporar los trifosfatos marcados y no marcados (dNTPs) en el ADN. La reacción consta de los siguientes pasos:

El ADN de doble cadena es desnaturalizado (a 100ºC) en ADN de cadena simple. Los oligonucleótidos se unen al azar en forma complementaria a este ADN de simple cadena.

Los terminales 3'-OH de los oligonucleótidos sirven como cebadores de la actividad 5'-3'de la enzima "klenow".

- Al incluir los dNTPs marcados en la mezcla, la cadena recientemente sintetizada quedará marcada.

3.5.1.3. Marcado por PCR:

Este método es una modificación del método del Oligolabelling. La reacción emplea la enzima *Taq* polimerasa que presenta una actividad polimerasa 5'-3' y que alcanza su máximo nivel de reacción a los 72ºC.

Para realizar la marcación se mezcló el ADN blanco con los nucleótidos marcados, los nucleótidos no marcados, primers o cebadores específicos, la enzima *Taq* polimerasa y el buffer 10X de la enzima (provisto por el fabricante de la enzima) en tubos tipo "eppendorf" colocados sobre hielo

Luego se colocaron en un termociclador (PCR) que se programó con las temperaturas correspondientes así como con el número de ciclos necesarios.

Los pasos de la reacción son los siguientes:

Desnaturalización: El ADN templado se hace de simple cadena al calentarlo entre 92°C y 98°C.

Unión complementaria del cebador: Un par de cebadores específicos se unen a la cadena simple de ADN a una temperatura de entre 37°C y 72°C.

- Síntesis de ADN: Los cebadores que se unieron sirven como sustrato para la *Taq* polimerasa y la síntesis del ADN complementario se produce a una temperatura que oscila entre los 70°C y los 74°C.

Estos tres pasos se repiten 40 veces en el termociclador; lo cual permite la amplificación del ADN blanco que queda entre los dos cebadores complementarios.

Luego se chequea el éxito de la marcación por electroforesis, sembrando 5 ul de la solución obtenida en un gel de agarosa. Aquí el ADN que ha incorporado los nucleótidos marcados va a migrar más lentamente que el no marcado.

3.5.2. Tipos de detección de la marcación enzimática:

3.5.2.1. Métodos directos:

La marca se incorpora en el ácido nucleico de la sonda y ésta puede ser visualizada directamente. Ejemplos de estas marcas son el fluorocromo tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC, un derivado de la rodamina), el cual se acopla químicamente al extremo terminal del ARN. Otras marcas son los nucleótidos marcados con fluorocromos como el fluorecein isothiocianato (FITC),

la rodamina (TRICT) y el 7-amino-4-methyl-coumarin-3-acetic acid (AMCA), los cuales pueden ser incorporados enzimáticamente dentro de los ácidos nucleicos.

Si bien el método directo es rápido, es menos probable que permita detectar secuencias únicas o de bajo número de copias.

3.5.2.2. Métodos indirectos:

La marca que se incorpora al ácido nucleico no se puede visualizar directamente. Consiste en marcar la sonda con un anticuerpo anti-fluoresceína que luego de hibridar con el ADN blanco, se unirá con una molécula de fluoresceína (comunicadora o "reporter") la que permitirá visualizar la señal.

3.5.3. Estimación del rendimiento de la marcación por Dot-blot

El procedimiento consiste en una hibridación ADN/ADN sobre una membrana de nylon.

- Se realizaron una serie de diluciones del ADN control en buffer TE (10mM Tris-HCl + 1 mM EDTA, pH 8, ver anexo).

  Se marcaron sitios de siembra en una membrana de nylon y se identificaron con cada siembra.
- Se sembró 1 ul de cada dilución de la reacción de marcado sobre la membrana.
- Se fijó el ADN con luz ultravioleta o a 80ºC.
- Se lavó la membrana con buffer 1 de lavado (0.1 M Tris-HCl + 0.15 M ClNa, pH7.5, ver anexo).

  Se incubó con buffer 2 (0.5% de un agente bloqueante, como ADN de esperma de salmón, disuelto en el buffer 1, ver anexo) durante 30 minutos.

  Se realizó una dilución 1:5000 de Anti-Dig-fosfatasa alcalina en buffer 2 y se incubó la membrana en el anticuerpo con agitación durante 30 minutos.

  Se lavó dos veces durante 15 minutos en buffer 1 de lavado.

- Se incubó la membrana en buffer 3 (0.1M Tris-HCl + 0.1M ClNa + 50uM Cl_2Mg, pH9.5, ver anexo) durante 2 minutos. El Cl_2Mg activa la fosfatasa alcalina que se encuentra unida al anticuerpo.

  Se mezclaron 45 ul de solución colorante NBT y 35 ul de x-phosfatasa en buffer 3.

  Se descartó el buffer de la membrana y se agregó la solución de sustrato y colorante. Se dejó que el precipitado coloreado se forme en oscuridad (la reacción se completa a las 16 horas).
- Cuando se desarrollaron las bandas hasta la intensidad deseada, se detuvo la reacción lavando la membrana durante 5 minutos con 50 ml de buffer TE pH8 (ver anexo).
- Se compararon las intensidades de las manchas del ADN control (que viene en el kit comercial de marcación) con las diluciones experimentales para estimar la concentración de la sonda marcada

3.6. Las sondas utilizadas en este estudio

3.6.1. Para estudios de GISH

Para este tipo de estudios se utilizaron sondas de ADN genómico total, marcado y no marcado, de los distintos taxones del género *Zea* mencionados en MATERIALES.

3.6.2. Para estudios de FISH

3.6.2.1. Sondas del "Knob" de maíz:

Las secuencias repetitivas de las familias "180-pb" y TR-1 (Peacock *et al.*, 1981; Ananiev *et al.*, 1998) de los segmentos heterocromáticos "knob" del maíz fueron obtenidas del "GenBank" (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Utilizando el

programa "Primer3" versión 0.6, diseñado por Rozen y Skaletsky (2000) para el White Institute for Biomedical Research & Howard Hughes Medical Institute, USA (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html) se diseñaron los "primers" para amplificar las dos familias componentes de los "Knobs". Luego se ordenó la síntesis de estos "primers" en PROMEGA S. A. Las secuencias de cebadores diseñadas fueron:

- Para amplificar la secuencia "180- pb"

  Sense: 3' (ATAGCCATGAACGACCAT) 5'

  Anti-sense : 5' (ACCCCACATATGTTTCCT) 3'

ggccacacaaaccccatttttgtcgaaa**atagccatgaacgaccatt**ttcaataatatcgaaggctaacacctacggatttttgaccaaga
aatggtctccaccagaaatccaagaatgtgatctacgac**aaggaaacatatgtggggt**gaggtgtacgagcctctggtcgatgatcaat

La figura muestra la unidad de repetición de la familia "180-pb" (No de acceso al GenBank: M32534) y la posición de los cebadores diseñados en "negrita".

- Para amplificar la secuencia TR-1 :

  Sense: 3' (TCAACTTTTAAACCACAAATGATG) 5'

  Anti- sense: 5' (GTTTGGACAGTTCACTCATGCA) 3'

catatgtttccttgccatatatcacattcttggatttcttggtcaaaaatctgtaggtgttagcctttggtatttttgaaaatggtcggtcataatattttc
gaaaaatgggggttgtgtggccacctgtatggtattagagtacaactattggatgaagacgctagtgggctagctaatgatcttttgtgataac
aggtttcctataatccccactattcaaggaatacttaaacggtgtttatgtccactcaagtaaaacgccacacatcaatttgccacatcgattct
caaaataaaataaagatgataaaaagttggaatataaagaattcaatacaatagta**tcaacttttaaaccacaaatgatg**tttccatgatg
tcaagggcattatattcggatgagagggtattagagtacaactagtggatgaagatgtcatttggctagataatgaccttttgtgataccaggtt
tcctataatcccctctattcaaaggatacctagatggtgtttatgtccactcaagtaaaacaccacacatcaatatgacacatcatttctaaaa
ataaaataaagactatggaaaatttagccaaa**ttgcatgagtgaactgtccaaac**ataggttaaggttgtaaggcaatttttccaccatat
agttgctaaaaagttggaatataacacctacggatttttgaccaagaaatggacccaccaaaaatccaagaatgcaatctatggcaagaa
aaaatatttgggtgaagtttacaaacctctagtcgatgaataatggccacacaacaccatttttttggaaaatagcatgtacgaccattttcaat
aataccgaaggtcacactacggtttttgaccaaaatttggtntcttctaggaatccaaggaagtcaaaaatagcatgaacgaccattttcaat
aatactgaaggctgacacctacagatttttgaccaagaaatggtctccaacagatatccaaaattgtgatctatggtaaggaaacacatgtg
ggttcaggcgtacgagcctatggtcgatgatcaatggctagacaacccccattttgtcgaaaatagcatgaacggccattttcaataatacc
gaagtctatcacctacggattgttgacgaagaaatggtctccaccagaaatccaagaatgtgatctatgtcaaggaaacatatg

La figura muestra parte de la secuencia de la familia TR1 (No de acceso al GenBank: AF071127) con la posición de los cebadores diseñados en negrita

El procedimiento de amplificación a partir de estos "primers" fue el siguiente: Se prepararon las mezclas de amplificación en tubos eppendorf, sobre hielo, colocando en cada uno 5 ul de una dilución del ADN (50-100 ng), 10 ul de una mezcla de nucleótidos (dNTPs) (200 uM de cada dNTP), 3 ul de ClMg (2.5

mM), 0.25 ul de enzima *Taq* polimerasa (1 unidad), 3 ul de buffer 10 X de *Taq* (provisto por el fabricante de la enzima), 5 ul de una dilución de cada "primer" (1uM de cada uno) y agua destilada estéril hasta un volumen total de 30 ul. Como moldes se utilizó ADN genómico total de *Zea luxurians*, *Zea mays* ssp. *parviglumis*, *Zea mays* ssp. *mexicana*, *Zea mays* ssp. *mays* (línea WxEB y raza Amarillo Chico).

Los ciclos de amplificación en el termociclador fueron los siguientes:

- 1 ciclo de 4 minutos a 94°C
- 35 ciclos de 1 minuto a 94°C (apertura de la doble hélice), 1 minuto a 47°C (hibridación del cebador y síntesis del ADN) y 1 minuto a 72°C (fase de elongación)
- 1 ciclo de 1 minuto a 72°C.

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en un gel 0.8% de agarosa para calificar los resultados comparando las bandas obtenidas con las de un marcador de peso molecular conocido (ver anexo). Las bandas obtenidas se recortaron del gel, bajo un transiluminador de luz ultravioleta y se almacenaron a 4°C en tubos tipo "eppendorf" estériles. Las secuencias amplificadas se extrajeron del gel mediante "kits" comerciales de elusión de bandas como el "Gel Extraction Kit" (Ambión, cat. N° 1950) o el "Kit Gel Extraction (QuiaGen, cat. N° 28704), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Finalmente se tomaron 3 ul del producto de la elusión y se realizó una nueva corrida electroforética en gel de agarosa para cuantificar los resultados.

3.6.2.2. Porciones de ADN ribosomal del trigo hexaplóide

- pTa 71: Porción ribosomal 45s del trigo hexaplóide (*Triticum aestivun)*. Fragmento de 9 kb inserto dentro del plásmido PuC 18 polylinker que mide 2.68 kb. Enzima de restricción: Eco R1. Este fragmento se corresponde con las regiones organizadoras nucleolares.

- pTa 794: Porción ribosomal 5s del trigo hexaplóide (*Triticum aestivun)* dentro del plásmido PBR 322. Enzima de restricción: Bam H1.

Con el objeto de obtener estas secuencias en alta concentración, estas fueron incluidas en plásmidos y se realizó la multiplicación de los cultivos bacterianos de *Echerichia coli* como fue explicado en secciones anteriores.

Luego de multiplicar las distintas colonias de bacterias, conteniendo cada una los diferentes insertos, se procedió a la extracción del ADN plasmídico mediante la técnica de "miniprep".

Todas estas secuencias fueron marcadas con digoxigenina (Dig High Prime, Boehringer Mannheim, Germany), rodamina y/o biotina (Biotin Nick Traslation, Boehringer Mannheim, Germany) para ser utilizadas luego como sondas en experimentos de hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

3.7. Hibridación *in situ* (GISH-FISH)

La técnica de hibridación *in situ* utilizada se realizó según Cuadrado y Jouve (1995), con modificaciones (Poggio *et al.*, 1999a y b)

3.7.1. Obtención de preparaciones de cromosomas vegetales:

Ver punto 2.1 de Métodos.

3.7.2. Pretratamientos y lavados

Antes de la hibridación *in situ* el material debe ser pre-tratado con el fin de reducir la hibridación indeseada de las sondas a sitos "no blancos" y/o a otras moléculas inespecíficas. Estos pasos ayudan también a que las sondas y los reactivos de detección penetren hasta el ADN y mantienen la estabilidad de las secuencias blanco frente a los distintos tratamientos.

- Tratamiento con RNAsa: Se colocó la enzima a una concentración de 100 mg/ml y se cubrió un cubreobjetos plástico. Se incubó en cámara húmeda, a 37° C durante 1 hora. Esta enzima degrada el ARN.

Tratamiento con paraformaldehído: Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Este paso fija a los cromosomas.

Se lavan los preparados en buffer 2XSSC (ClNa 0.3M + Citrato de Sodio 30mM, pH 7, ver anexo) a temperatura ambiente. Se realizan tres lavados de 5 minutos cada uno y con agitación.

- Deshidratación: Se incubaron los preparados en una gradación de alcohol etílico que va desde 70% hasta 100%, durante 3 minutos en cada una y a temperatura ambiente.

  Se dejaron secar los portaobjetos al aire durante al menos 2 horas.

3.7.3. Preparación de la mezcla y proceso de hibridación *in situ*

Las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la cinética de la hibridación *in situ* dependen fundamentalmente de la cinética de reacción de la doble cadena de ADN. La estabilidad de esta doble cadena puede determinarse a través de su Tm, que es la temperatura a la que la mitad de la molécula dúplex se disocia en dos hebras simples. Esta temperatura depende de muchos factores como la concentración de G-C, la concentración de cationes (Na^+) en la solución de hibridación, el largo de la sonda y la concentración de formamida a utilizar.

Procedimiento:

La mezcla de hibridación se preparaba inmediatamente antes de su uso.

Se colocó en un tubo tipo "eppendorf": Formamida dehionizada pura (que permite alcanzar las distintas temperaturas sin que se dañen los cromosomas), Sulfato de Dextrano (que concentra la sonda sin modificar la astringencia), buffer 2XSSC (que ayuda a estabilizar la doble hélice de ADN), Sodio Dodecil Sulfato-SDS 10% (que ayuda a la penetración de la sonda), el ADN competidor (que actúa como bloqueante específico) y el ADN de esperma de salmón (que reduce la hibridación inespecífica). Ver anexo.

Se mezclaba muy bien con vortex y se centrifugaba brevemente.

Se agregó la sonda marcada y se volvió a mezclar.

- Se desnaturalizó la mezcla de hibridación a 70°C durante 15 minutos.
- Se incubó en hielo durante 5 minutos para mantener las dos hebras de ADN separadas.
- Se agregaron 30 ul de la mezcla a cada preparado y se cubrió con un cubreobjetos plástico.
- Se llevaron las preparaciones a un termociclador el cual se programó en forma adecuada para cada material.
- Se colocaron las preparaciones en cámara húmeda en buffer 2XSSC y se incubaron en estufa a 37°C durante toda una noche.

3.7.4. Remoción de la sonda que hibridó de forma inespecífica o no se unió:

Las condiciones de astringencia determinan el porcentaje de nucleótidos que se aparea correctamente entre la sonda y el ADN blanco. La astringencia depende directamente del Tm y se controla a través de las condiciones iónicas y concentraciones de formamida en la solución de hibridación y de las temperaturas y concentraciones iónicas de los lavados de post-hibridación.

En todos los experimentos realizados para este trabajo de tesis los lavados de post-hibridación se realizaron en condiciones de alta astringencia y con agitación.

Lavados de post-hibridación: se colocaron los preparados en cubetas de vidrio con tapas (cajas tipo "Coplins") y se añadieron las soluciones en forma secuencial descartando las anteriores. Los lavados fueron realizados en las siguientes soluciones: 2XSSC a 42°C durante 5 minutos, Formamida dehionizada al 20% (v/v) en 0.1XSSC a 42°C durante 10 minutos, 0.1XSSC a 42°C durante 5 minutos, 4XSSC/Tween (0.2%) a 42°C durante 5 minutos y finalmente dos lavados en 4xSSC/Tween (0.2%) a temperatura ambiente durante 5 minutos cada uno. Ver anexo.

3.7.5. Detección visual de los sitios de hibridación:

Como la mayoría de las sondas marcadas en forma no radioactiva son inmunológicas, se detectan con anticuerpos los cuales se montan sobre la marca (por ejemplo: anti-digoxigenina).

El sistema que genera la señal fluorescente en los sitios de hibridación puede consistir de uno o dos pasos:

1) A la marca incorporada a la sonda e hibridada a la secuencia blanco se le acopla el anticuerpo que lleva el sistema generador de señal.
2) A la marca incorporada a la sonda hibridada a la secuencia blanco se le acopla un anticuerpo primario (que no lleva la señal) y a este último se le coloca un anticuerpo secundario que genera la señal.

El método 2 es el más sensible porque puede acoplar muchos anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario, y así aumentar la señal.

Procedimiento:

Se preparó una solución de BSA (Bovine Serum Albumine, Sigma) al 5 % (p/v) en 4XSSC/Tween y se mezcló bien utilizando vortex. Se añadieron 100 ul de esta solución a cada preparación y se colocó un cubreobjetos de plástico. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. La BSA hibrida sobre sitios inespecíficos.

- Se dejó drenar la solución de BSA quitando el cubreobjetos plástico.

Para sondas marcadas con digoxigenina se preparó una solución con anti-digoxigenina-FITC (Boehringer Mannheim, Germany): BSA (1:50) y se añadieron 50 ul a cada preparación. Se colocó otro cubreobjetos plástico y se incubó a 37°C durante 1 hora, en cámara humedecida en 2XSSC.

Para sondas marcadas con biotina se agregó Texas Red o Streptavidine-CY3 (Sigma) en las diluciones aconsejadas por el fabricante.

- Se cubrieron las cajas Coplins y las cámaras húmedas a fin de trabajar en oscuridad pues la fluorescencia decae con la luz.
- Se lavaron las preparaciones en 4XSSC/Tween tres veces durante 10 min. cada una.
- Se añadieron 100 ul de DAPI (2 ug/ml) y se colocó un cubreobjetos plástico para incubar en oscuridad durante 15 minutos. Este colorante se utilizó como tinción de contraste y además para obtener datos de bandeo DAPI pues tiñe con más intensidad las zonas heterocromáticas ricas en A-T.

  Las preparaciones se lavaron brevemente por drenado en 4XSSC/Tween para eliminar los cubreobjetos.

  Se colocaron 2 gotas del medio de montaje Vecta-Shield (Vecto Lab., H-1000) que evite que la fluorescencia decaiga rápidamente. Se colocó un cubreobjetos de vidrio (de 22 mm x 40 mm) y se presionó sobre un papel de filtro para quitar los excedentes.

  Los preparados se guardaron en oscuridad al menos 12 horas antes de observar a 4°C.
- Se observaron y fotografiaron en un microscopio epifluorescente (Axiophot de Carl Zeiss), utilizando los filtros apropiados para excitar a los diferentes fluorocromos.

  Las microfotografías se realizaron probando diferentes intensidades y tiempos de exposición de las películas fotográficas (Kodak Color Gold de 400 asas de sencibilidad). Las microfotografías pueden realizarse exponiendo la película una o dos veces (alternando distintos filtros), obteniéndose fotografías de simple o doble exposición respectivamente. Esto último puede ser necesario para localizar a las sondas puntuales sobre los cromosomas contrateñidos con DAPI.

4. Realización de cariotipos y láminas

La determinación de los parámetros del cariotipo fue realizada, sobre fotografías digitalizadas, con la ayuda de un programa del Departamento de Biología de la Universidad de Colorado (USA): MicroMeasure Versión 3.3 disponible www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure.

La nomenclatura utilizada para la descripción morfológica de los cromosomas fue la propuesta por Levan *et al.* (1964) y el método de determinación el propuesto por Naranjo y colaboradores (1986).

Para la construcción de los idiogramas se utilizó el programa Corel DRAW versión 5.0 de Microsoft perteneciente al CIGEN (UNLP-CIC-CONICET).

Las láminas fueron realizadas con fotografías digitalizadas utilizando los programas Adobe Photo Shop versión 6.0 y Corel DRAW versión 5.0 de Microsoft, pertenecientes al CIGEN (UNLP-CIC-CONICET).

Resultados

RESULTADOS

1. Análisis de las afinidades genómicas entre los taxones del género *Zea* mediante estudios meióticos

Con el propósito de analizar las afinidades genómicas entre las distintas especies y subespecies de *Zea*, se realizaron estudios meióticos en cinco híbridos F1 (Figura 3). Dos de ellos fueron obtenidos en el campo experimental a través de cruzamientos programados para este trabajo de tesis (*Zea luxurians* x *Zea mays* ssp. *mays* y *Zea luxurians* x *Zea mays* ssp. *parviglumis*); mientras que, los otros, son híbridos artificiales que se mantienen en cultivo en el IFSC (Figura 3). Todas las especies progenitoras de estos híbridos presentan 2n=20 cromosomas, excepto *Zea perennis* que posee 2n=40. La meiosis de las especies con 2n=20 es regular, con formación de 10 bivalentes (II) en diacinesis y metafase I (Molina y Naranjo, 1987; Naranjo *et al.*, 1990) (Figura 4 A y B). En *Zea perennis* la configuración meiótica más frecuente fue de 5 IV + 10 II (Fig. 4 E).

A continuación se describen las distintas características de los híbridos analizados, y al final se muestra la tabla 2 que resume toda la información.

1.1. Meiosis del híbrido *Zea luxurians* x *Zea diploperennis* (2n=20)

El análisis del híbrido *Zea luxurians* x *Zea diploperennis* mostró que, en un total de 84 células estudiadas en diacinesis-metafase I, la configuración meiótica más frecuente fue de 8II + 4 I (Figura 5 C) (Tabla 2). Otras configuraciones observadas fueron: 10 II; 9II + 2 I (Fig. 5 A y B); 7II + 6 I y 6II + 8I. En todos los casos se observaron notorias diferencias en el tamaño de los univalentes, lo que se correspondería con el elevado número de bivalentes heteromorfos observados (Figuras 5 A-C). Estos univalentes quedaron rezagados en anafase I (Figura 5 D) y frecuentemente dividieron precozmente sus cromátidas. En el 30% de las células estudiadas se observaron dos grupos separados de 10 cromosomas cada

uno (por ejemplo: 4 II + 2 I formando un grupo y 5 II formando el otro grupo) (Figura 5 B).

Por último, cabe destacar que este híbrido es altamente estéril ya que mostró una tinción de polen menor al 10% y muy baja producción de semillas viables (menos del 2%) (Poggio *et al.*, 1999b).

1.2. Meiosis del híbrido *Zea luxurians* x *Zea perennis* (2n=30)

Los estudios citogenéticos realizados sobre 46 células de este híbrido mostraron que la configuración meiótica más frecuente (53 %) fue de 5 III + 5II + 5 I (Figura 6 A). Los valores medios de estas configuraciones se exponen en la tabla 2. Además, se observó un máximo de 8 III en el 10 % de las células estudiadas. Esta distribución de configuraciones meióticas es coincidente con la observada al estudiar otros híbridos con 2n=30 (Molina y Naranjo, 1987; Naranjo *et al.*, 1990; Naranjo *et al.*, 1994). Un estudio más detallado de los trivalentes mostró que muchos de ellos son del tipo sartén ("fry-pan"), es decir que están formados por un par de cromosomas unidos por al menos dos quiasmas, los que forman un anillo, y unidos a un tercer cromosoma por al menos un quiasma, en uno sólo de sus extremos (Figuras 6 A-D). Cabe destacar que, a diferencia del híbrido anterior, los bivalentes son homomórficos (Figuras 6 A-D) y frecuentemente están agrupados (Figura 6 A).

1.3. Meiosis del híbrido *Zea luxurians* x *Zea mays* ssp. *mays* (2n=20)

Este híbrido artificial se obtuvo a partir de la realización de un número aproximado de 100 cruzamientos dirigidos, para lo cual se utilizó siempre a *Zea luxurians* como progenitor femenino. Como resultado de estos cruzamientos se obtuvieron alrededor de 20 semillas híbridas (F1). De estas semillas sólo cuatro germinaron y sólo dos se mantuvieron hasta plantas adultas. Estas plantas

híbridas fueron anuales y su morfología fue intermedia entre la de sus progenitores.

El análisis meiótico de 30 células de anteras jóvenes mostró la formación de 10 II, siendo la mayoría de éstos heteromórficos (Figuras 7 A-E, I). También se observó la formación de hasta 2 puentes y 2 fragmentos durante la anafase I (Figuras 7 F y G).

Otro hecho interesante observado únicamente en este híbrido fue el de la presencia de neocentrómeros que se activan en las regiones "knobs", tanto en metafase II como en anafase II (Figuras 7 H-N).

1.4. Meiosis del híbrido *Zea luxurians* x *Zea mays ssp. parviglumis* (2n=20)

Este híbrido artificial se obtuvo a partir de la realización de un número aproximado de 40 cruzamientos dirigidos, para lo cual se utilizó siempre a *Zea luxurians* como progenitor femenino. Como resultado de estos cruzamientos se obtuvieron alrededor de 60 semillas híbridas (F1). De estas semillas sólo 30 germinaron y sólo 4 llegaron a plantas adultas. Estas plantas híbridas fueron anuales y su morfología fue intermedia entre la de sus progenitores.

En metafase I la configuración meiótica más frecuente fue de 9 II + 2 I (Figuras 8 D y E) (Tabla 2). Algunos bivalentes fueron heteromorfos y los univalentes de distinto tamaño (Figura 8 E). En diacinesis fue frecuente observar dos grupos de 5 II cada uno (Figura 8 C). Este híbrido mostró además, una serie de irregularidades en la meiosis, como ser el apareamiento irregular en la zona de los knobs heterocromáticos en paquitene (Figuras 8 A y B) y formación de hasta tres puentes y fragmentos en anafase I (Figuras 8 F-H).

1.5. Meiosis del híbrido *Zea luxurians* x *Zea mays* ssp. *mexicana* (2n=20)

El análisis de 30 meiocitos de anteras jóvenes de este híbrido mostró que las configuraciones más frecuentes observadas en metafase I (70%) fueron de 7 II + 6 I y 8 II + 4 I (Figuras 9 B y C). Algunos de los bivalentes eran heteromorfos mientras que los univalentes eran de distinto tamaño (Figuras 9 B y C). El híbrido en este caso también mostró irregularidades meióticas como la desinapsis de todos sus cromosomas (Figura 9 A) observada en diacinesis (5% de las células analizadas); en anafase I la formación de 1 a 3 puentes y fragmentos (Figura 9 D); también en este estadio la formación de dos grupos de 5 cromosomas en cada uno de los polos (5% de las células analizadas) (Figura 9 E) y finalmente en metafase II dos grupos de 10 cromosomas cada uno (10% de las células estudiadas) (Figura 9 F).

HÍBRIDOS	Configuraciones meióticas $\bar{X}$±ES I	II	III	Configuración meiótica más frecuente	N° de células	Observaciones
Z. luxurians x *Z. diploperennis* 2n=20	2,7 ±0,23	4,65 ±0,12		8II + 4I (50%)	84	II heteromorfos. Dos grupos de 5II en MI. I rezagados en AI. Asincronía meiótica.
Z. luxurians x *Z. perennis* 2n=30	4,7 ±0,20	4,76 ±0,23	4,26 ±0,19	5III + 5II + 5I (40%)	46	II heteromorfos agrupados. III "fry-pan"
Z.mays ssp. *mays* x *Z. perennis* 2n=30	5,00 ±0,27	5,38 ±0,22	4,75 ±0,18	5III + 5II + 5I (55%)	79	III "fry-pan"
Z. luxurians x *Z.mays* ssp. *mays* 2n=20	0,60 ±0,23	9,97 ±0,15	--	10II (97%)	45	Activación de neocentrómeros en las zonas de "knobs". II heteromorfos. 1-2 puentes con fragmento en AI
Z. luxurians x *Z.mays* ssp. *parviglumis* 2n=20	2,22 ±0,18	8,88 ±0,09		10II (27%) 9II + 2I (40%) 8II + 4I (28%)	99	II heteromorfos. Grupos de 5II c/u. Asincronía meiótica. 1-3 puentes con fragmento en AI.
Z. luxurians x *Z.mays* ssp. *mexicana* 2n=20	4,80 ±0,44	7,58 ±0,22		8II + 4I (37%) 7II + 6I (20%) 9II + 2I (19%)	64	II heteromorfos. Grupos de 5 cromosomas en Metafase II. 2 grupos de 5 cromosomas en cada polo de Anafase I. Asincronía meiótica. 1-3 puentes con fragmento en AI

Tabla 2: Configuraciones meióticas en híbridos artificiales

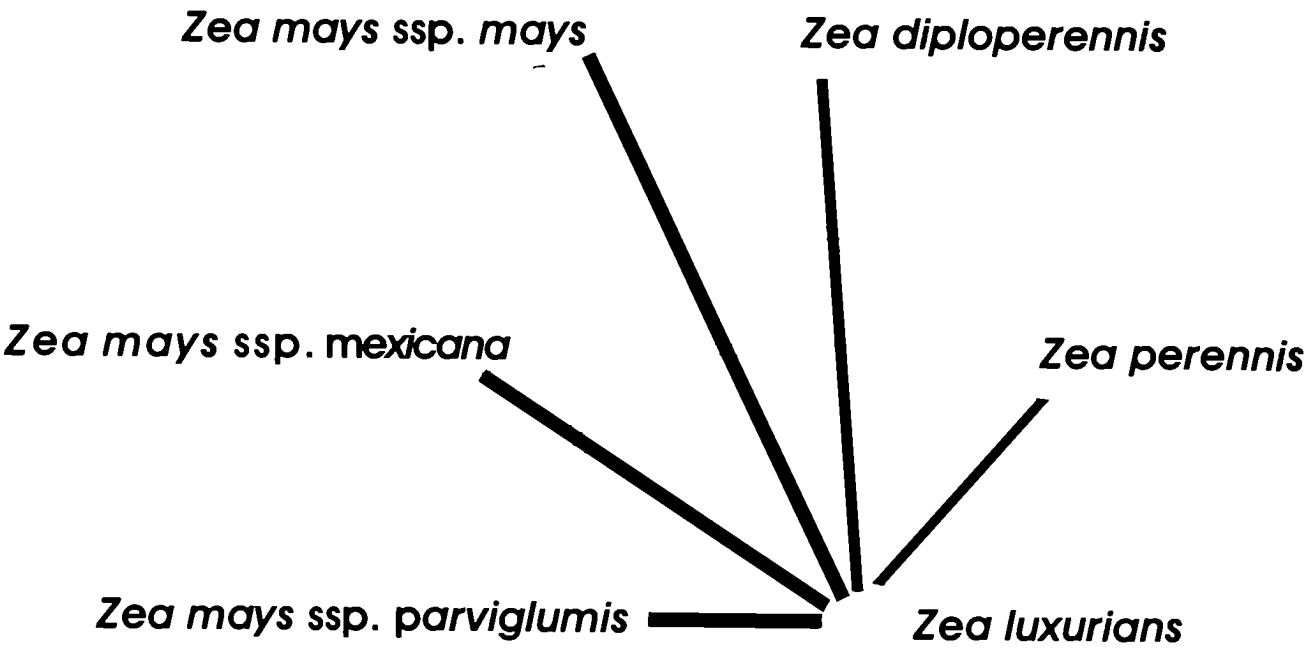


Figura 3: Híbridos artificiales inter e intraespecíficos dentro del género *Zea*. Líneas negras: realizados y estudiados en el presente trabajo de tesis. Líneas blancas: Estudiados por otros autores.

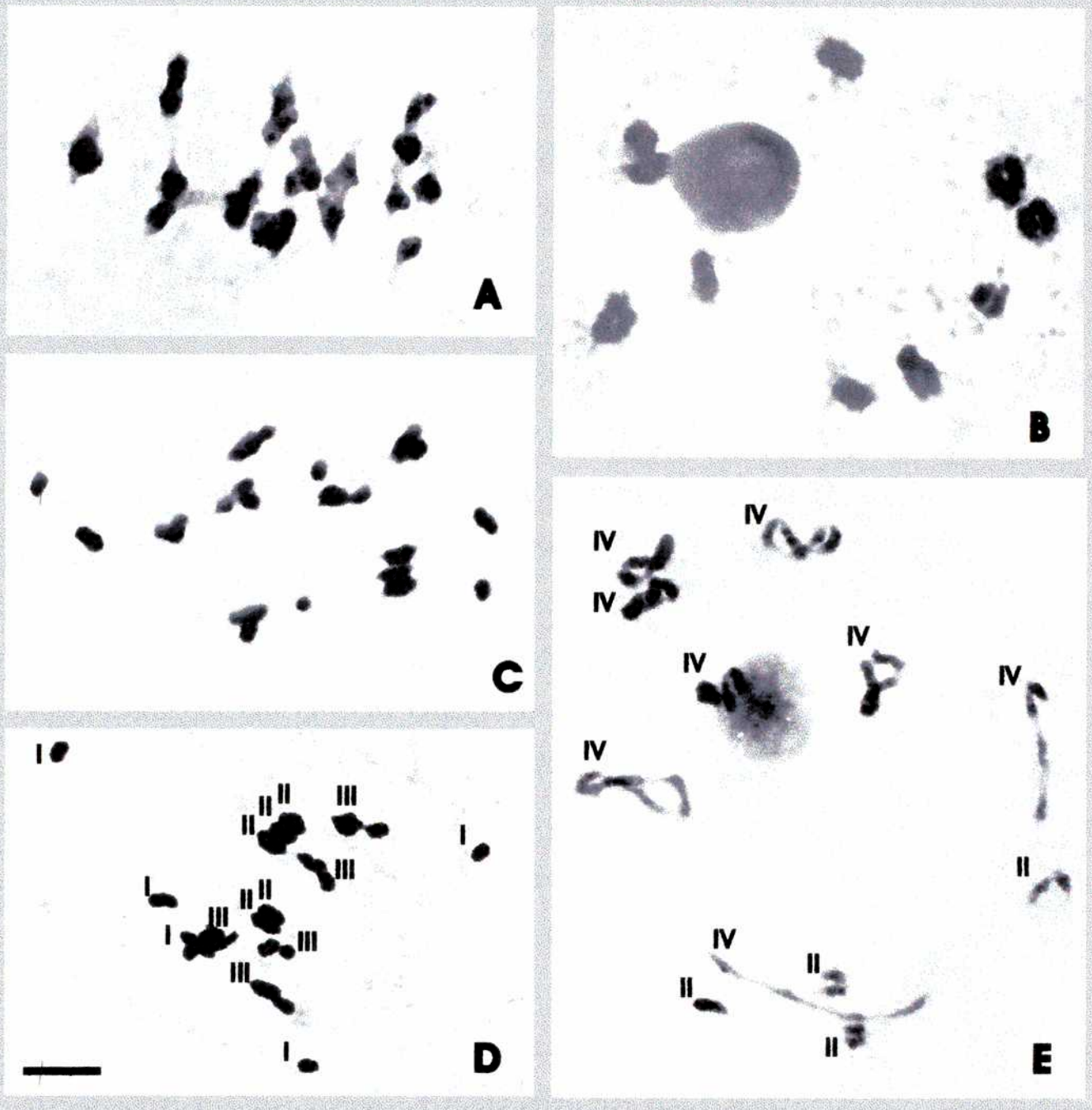


Figura 4: Comportamiento meiótico del híbrido F1 *Zea mays* ssp. *mays* x *Zea perennis* (2n=30) y el de sus progenitores. **A y B:** *Zea mays* ssp. *mays* (2n=20); **A:** metafase I: 10 II; **B:** diacinesis: 10 II en dos grupos de 5 II cada uno. **C y D:** *Zea mays* ssp. *mays* x *Zea perennis*, metafase I: 5 III + 5 II + 5 I. **E:** *Zea perennis* (2n=40), diacinesis: 8 IV + 4 II. **I:** Univalentes. **II:** Bivalentes. **III:** Trivalentes. **IV:** Cuadrivalentes. Barra= 10 *um*.

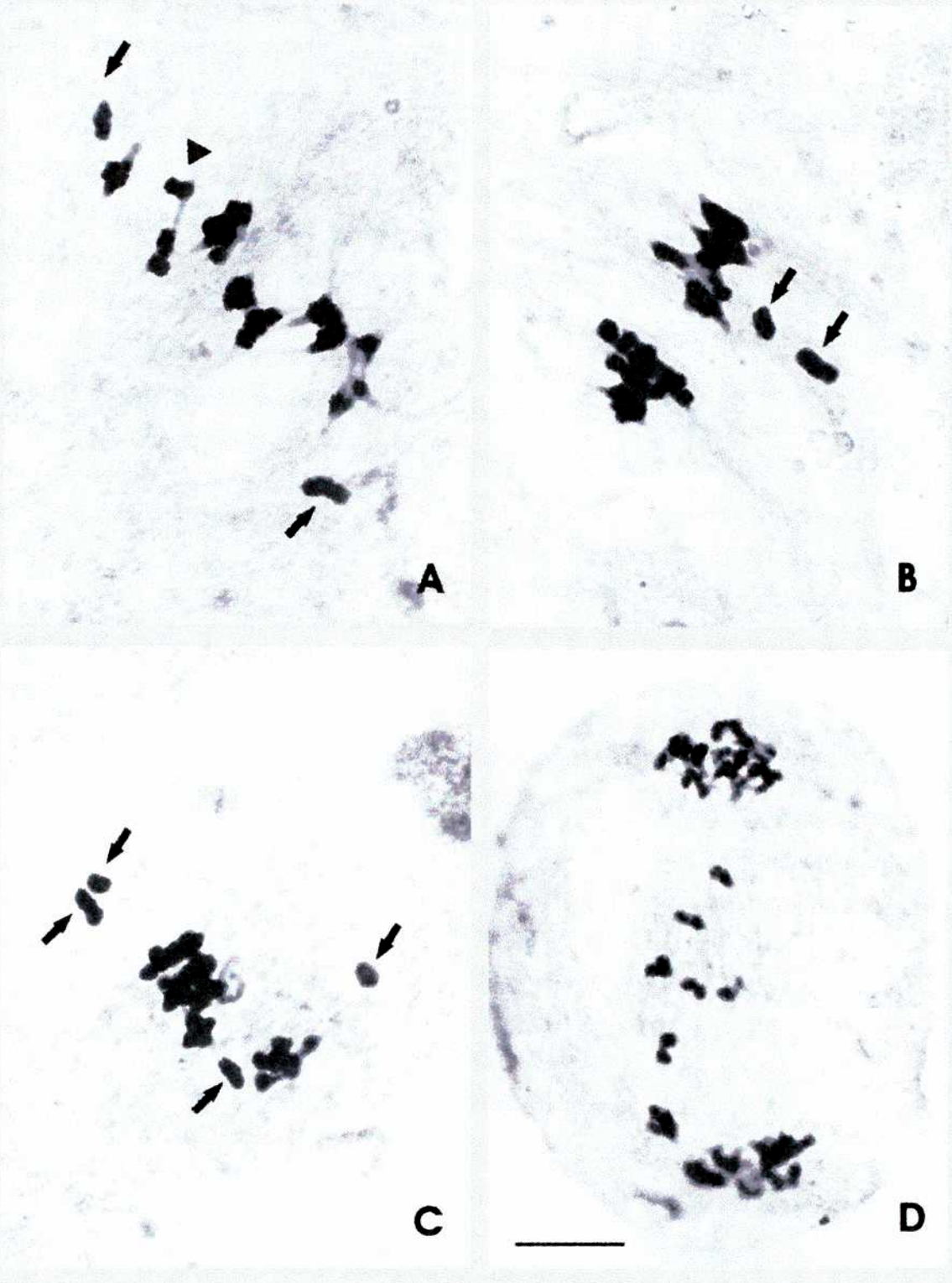


Figura 5: Comportamiento meiótico del híbrido F1 *Zea luxurians* x *Zea diploperennis* (2n=20). **A-C:** metafase I. **D**: anafase I. **A:** 9 II (uno heteromórfico) y 2 I de diferente tamaño. **B**: 9 II + 2 I de diferente tamaño, se observa separación de dos grupos compuestos por 5 II y 4 II + 2 I, respectivamente. **C:** 8 II + 4 I. **D:** I rezagados. Las flechas señalan los I. La punta de flecha indica un bivalente heteromórfico. **I:** Univalentes. **II:** Bivalentes. Barra = 10 *u*m.

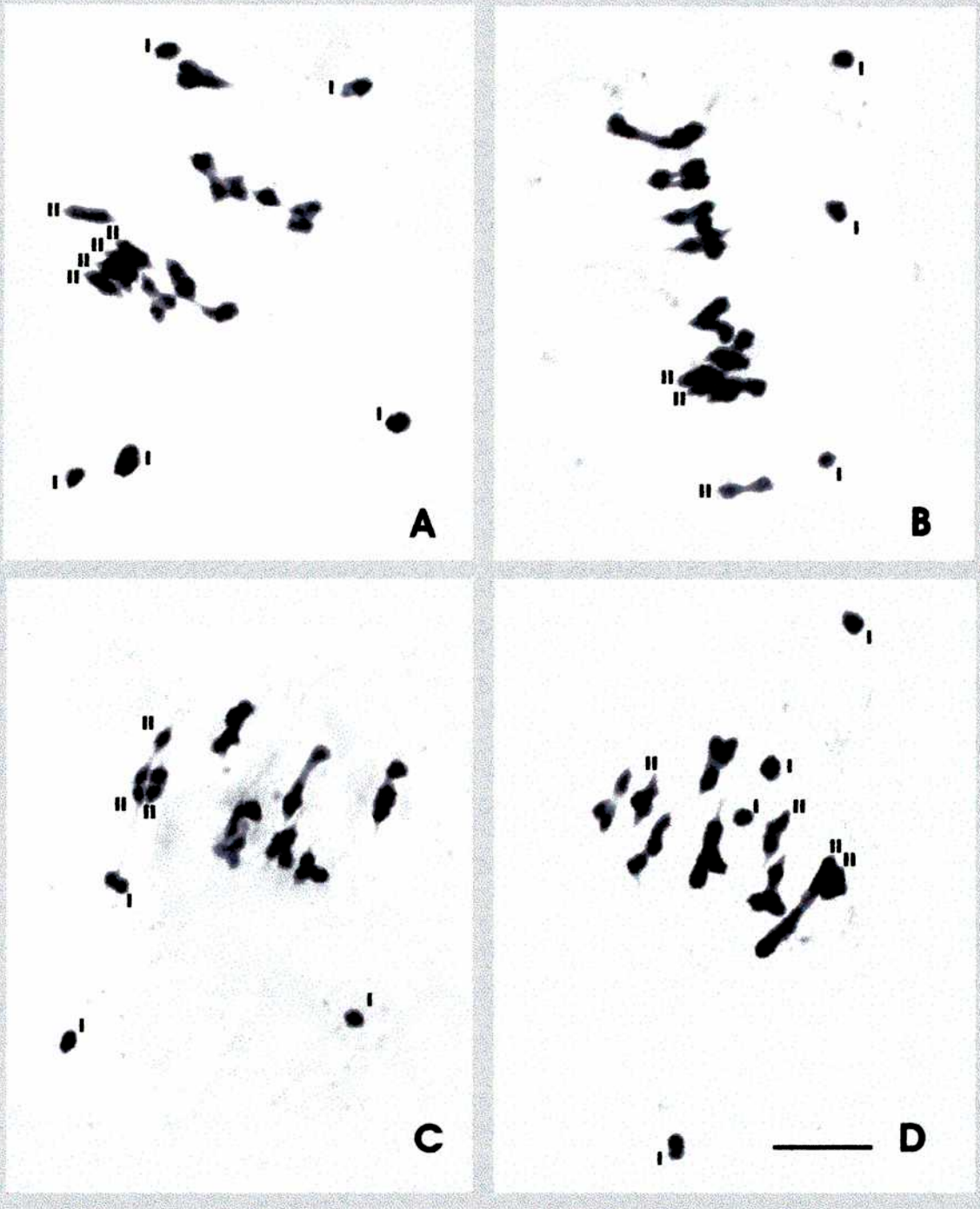


Figura 6: Comportamiento meiótico en metafase I del híbrido F1 *Zea luxurians* x *Zea perennis* (2n=30). **A:** 5 III + 5 II + 5I. **B y C:** 7 III + 3 II + 3 I. **D:** 6 III + 4 II + 4 I. Se indican sólo los univalentes (I) y los bivalentes (II), el resto son trivalentes de tipo "fry-pan". Barra= 10 *u*m.

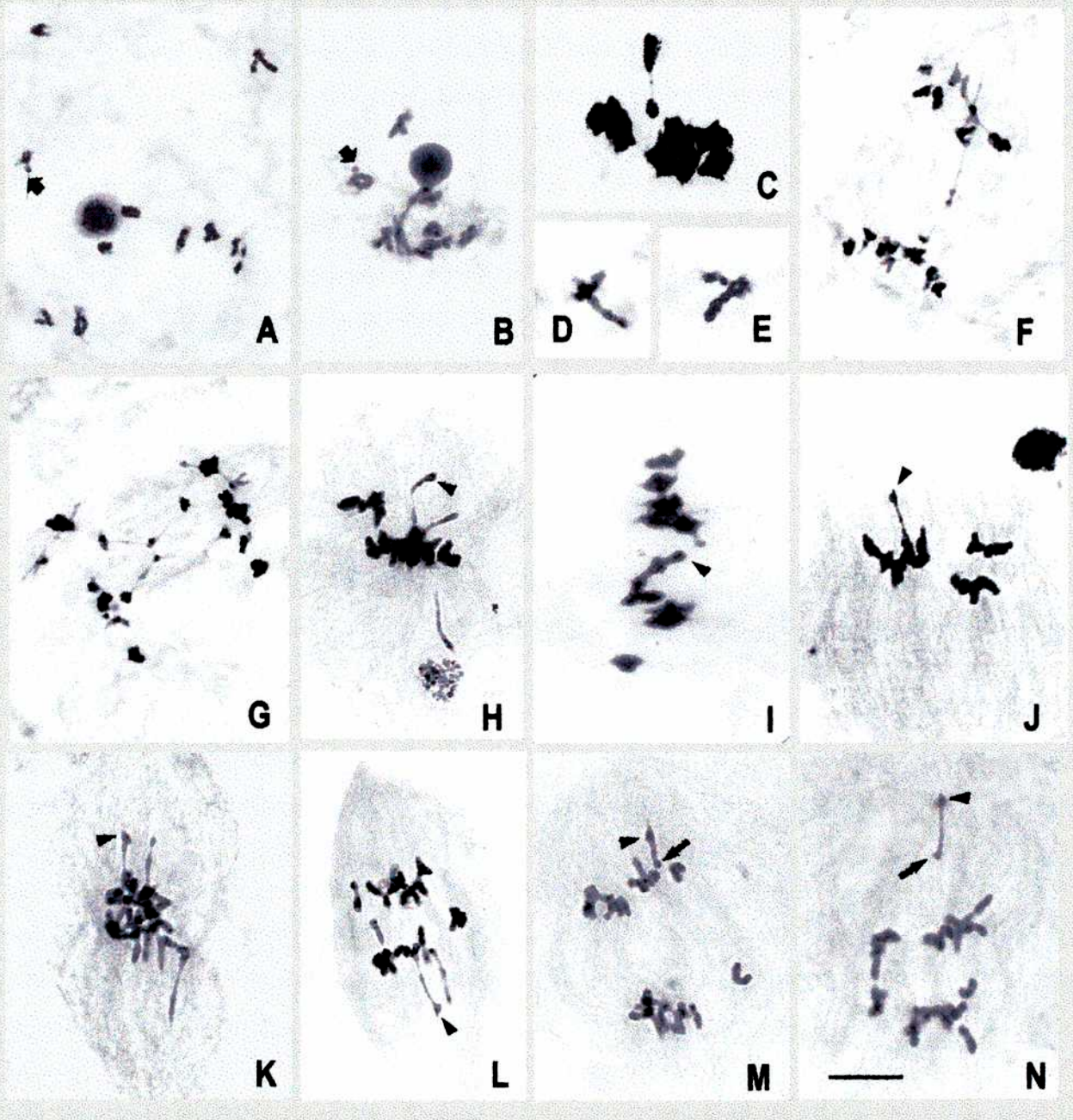


Figura 7: Comportamiento meiótico del híbrido F1 *Zea luxurians* x *Zea mays* ssp. *mays* (2n=20). **A y B:** Diacinesis: 10 II, varios de ellos heteromórficos; las flechas señalan algunos bivalentes heteromórficos en los que se observa un "knob" en uno de los cromosomas. **C:** Metafase I: se observa un II heteromórfico. **D y E:** Detalle de II heteromórficos en diacinesis. **F y G:** puentes en anafase I. **H-N:** Actividad neocentromérica; **I:** metafase I; **H, J y K:** metafase II. **L y N:** anafase II donde se observan cromosomas con neocentrómeros activados migrando hacia los polos. **H-N:** Las flecha indican la actividad neocentromérica de los "knobs" más pequeños y las puntas de flecha señalan la actividad neocentromérica de los "knobs" más grandes. Barra= 10 *um*.

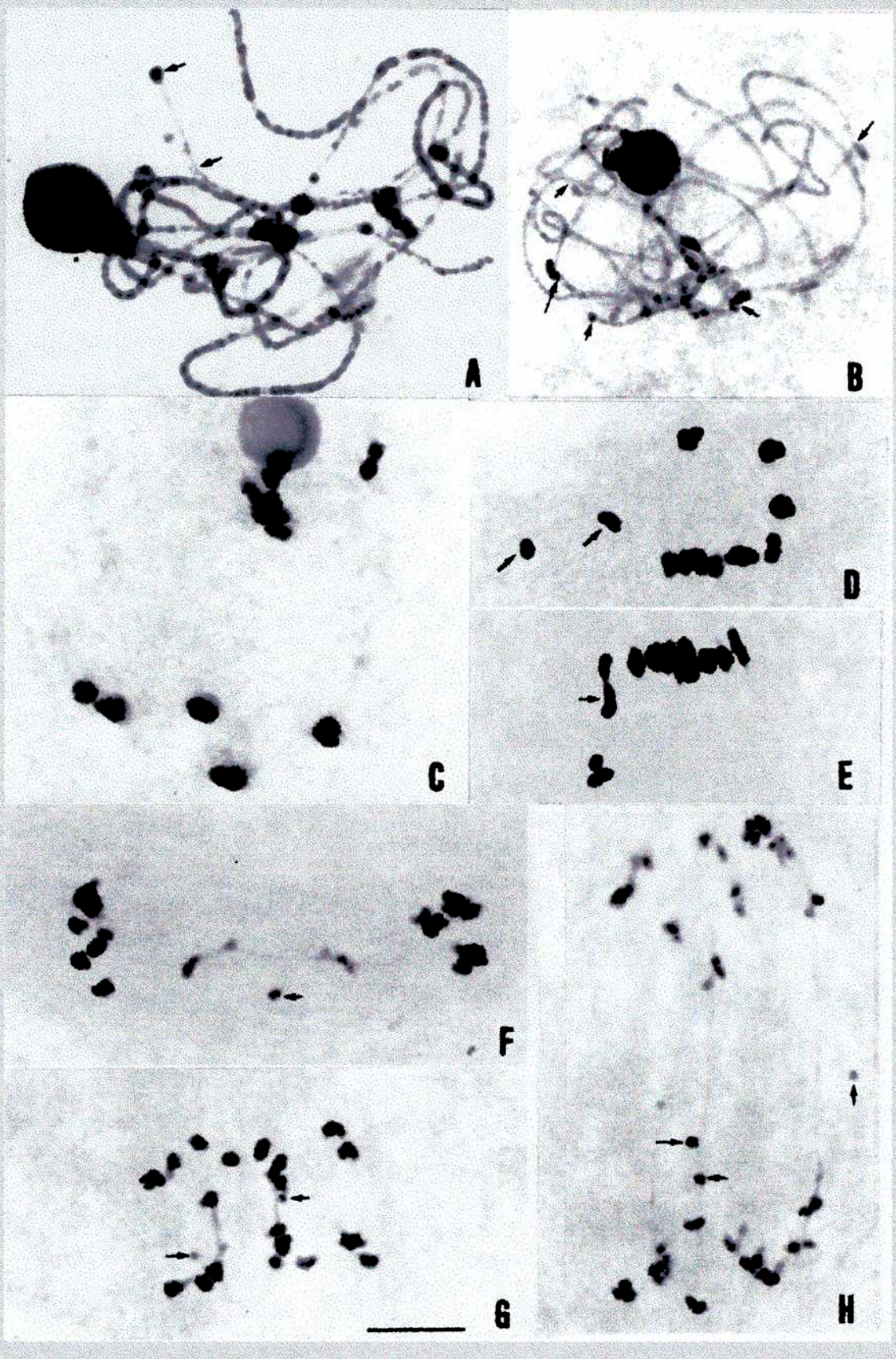


Figura 8: Comportamiento meiótico del híbrido F1 *Zea luxurians* x *Zea mays* ssp. *parviglumis* (2n=20). **A y B:** Apareamiento irregular en la zona de los knobs en paquitene, señalados por flechas. **C:** Dos grupos de 5 II cada uno en diacinesis. **D y E:** 9 II + 2 I en metafase I. Las puntas de flecha señalan a los I de distinto tamaño. La flecha, en E, indica un II heteromórfico. **F, G y H:** Puentes con fragmentos en anafase I. Las flechas indican los fragmentos. **I:** Univalentes. **II:** Bivalentes. Barra= 10 μm.

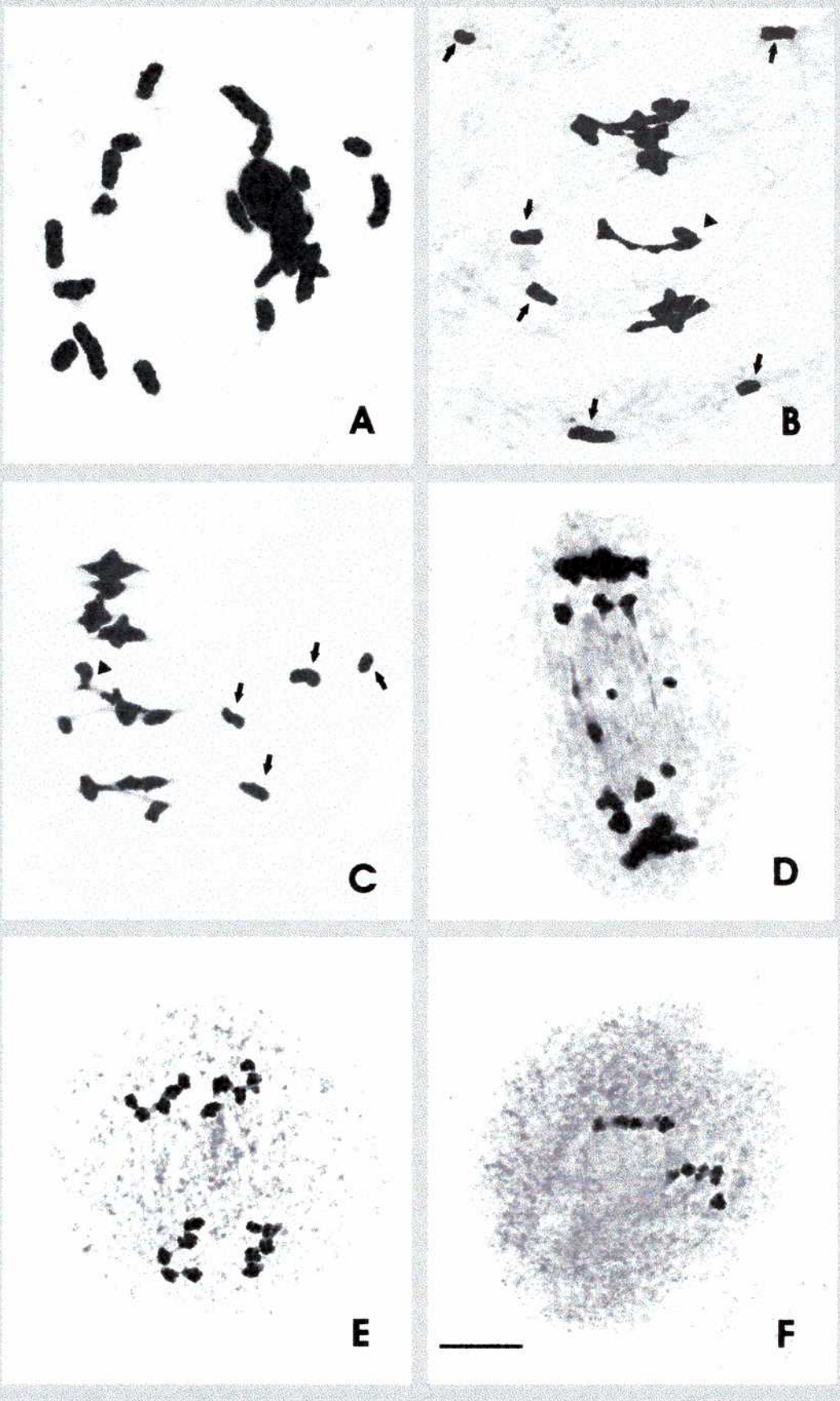


Figura 9: Comportamiento meiótico del híbrido F1 *Zea luxurians* x *Zea mays* ssp. *mexicana* (2n=20). **A:** Diacinesis: asinapsis de todos los cromosomas. **B y C:** Metafase I; **B:** 7 II + 6 I, y **C:** 8 II + 4 I. Las flechas señalan los I y las puntas de flecha indican II heteromórficos. **D:** Anafase I: dos puentes y dos fragmentos. **E:** Anafase I: dos grupos de 5 cromosomas cada uno, en cada polo. **F:** Metafase II: dos grupos de 5 cromosomas cada uno. **I:** Univalentes. **II:** Bivalentes. Barra= 10 *um*.

2. Análisis de las afinidades genómicas entre los taxones del género *Zea* mediante estudios citogenético-moleculares

Como se mencionó previamente, uno de los objetivos fundamentales de este trabajo de tesis es el de ahondar en el conocimiento de las relaciones evolutivas dentro del género *Zea*, utilizando como herramienta el análisis citogenético molecular. Este tipo de metodología es de suma utilidad cuando se quieren analizar las afinidades genéticas en especies de posible origen alopoliploide. En las próximas secciones se describen entonces los resultados obtenidos al realizar distintos experimentos de hibridación *in situ* fluorescente, los que complementan los ya observados al analizar las homologías cromosómicas de los distintos híbridos. Como una primera aproximación de este análisis citogenético molecular se aplicó la técnica de Dot-Blot, el cual permite estudiar de manera global las afinidades entre los distintos taxones. Luego se describen diferentes experimentos de GISH, los que permiten analizar con más detalle las afinidades observadas, estudiando la distribución de las secuencias homólogas entre los distintos cromosomas y eventualmente entre los distintos genomas. Con el fin de investigar posibles divergencias crípticas difícilmente detectables mediante técnicas de GISH convencionales, en algunos casos se aplicaron condiciones de alta astringencia y con bloqueantes genómicos. Por último se describen los estudios de FISH, los que tienen por objeto no sólo analizar la divergencia entre los distintos taxones con respecto a la presencia y localización de secuencias específicas, sino que también realizar mapeos físicos que puedan ser de utilidad para estudios de identificación cromosómica en el marco de programas de mejoramiento.

2.1. Experimentos de Dot-Blot: afinidades moleculares entre especies de la Sección Luxuriantes

Con la finalidad de detectar las afinidades moleculares entre las especies que componen la Sección Luxuriantes se realizó un estudio de Dot-Blot sobre membranas de nylon. Para ello se utilizaron como sondas el ADN genómico total de *Zea perennis, Zea diploperennis* y *Zea luxurians* marcado con digoxigenina, para ser hibridados en forma cruzada sobre diferentes concentraciones de ADN genómico total no marcado de las mismas especies. En este experimento se detectó hibridación cruzada entre todas las especies analizadas. Los puntos (dots) de hibridación sobre las membranas de nylon mostraron distintas intensidades de coloración, que son proporcionales a las afinidades entre las sondas y el ADN blanco. A partir de estas diferencias en las intensidades se pudo deducir que existe mayor homología molecular entre *Zea perennis* y *Zea diploperennis* que entre estas especies y *Zea luxurians* (Tabla 3).

Tabla 3: Afinidades genómicas relativas entre las especies de la Sección Luxuriantes analizadas mediante Dot-Blot.

	Zea perennis	***Zea diploperennis***	***Zea luxurians***
Zea perennis	+ + + +	+ + +	+ +
Zea diploperennis	+ + +	+ + + +	+ +
Zea luxurians	+ +	+ +	+ + + +

2.2. Experimentos de GISH: análisis de las afinidades genómicas entre especies de la sección Luxuriantes

2.2.1. *Zea luxurians, Zea perennis* y Zea diplopernnis

La hibridación *in situ* utilizando como sonda ADN genómico total de *Zea perennis* sobre cromosomas metafásicos de *Zea luxurians* reveló que la homología detectada por Dot-Blot (Tabla 3) no se distribuye homogéneamente sobre todos los cromosomas de *Zea luxurians*. Se observó que las regiones heterocromáticas DAPI + de las regiones teloméricas de los cromosomas de Zea *luxurians*, no hibridaron con el ADN genómico de *Zea perennis* (Figuras 10 A y B). Además, al menos dos pares de cromosomas de *Zea luxurians* presentaron una señal de hibridación muy débil, lo que estaría indicando una baja afinidad entre las secuencias componentes de estos cromosomas y las del genoma de *Zea perennis* (Figuras 10 A y B). Este último resultado sería coincidente con la formación de un máximo de 8 III observada en el estudio meiótico del híbrido F1 *Zea luxurians* x *Zea perennis*.

Se realizó también un estudio de GISH sobre cromosomas mitóticos de *Zea luxurians* usando como sonda el ADN genómico total de *Zea luxurians* marcado con biotina y bloqueando con ADN genómico no marcado de *Zea perennis*. En estas células metafásicas se observaron fuertes señales de hibridación en las regiones teloméricas, coincidiendo con la misma posición de las bandas DAPI + correspondientes a los "knobs" de *Zea luxurians* (Figuras 11 A-F). Este resultado, junto al experimento de GISH convencional, sin bloqueo, confirman que el genoma de *Zea perennis* carece de las secuencias repetidas que componen estas regiones DAPI + de *Zea luxurians*. Por otra parte, el resto de las regiones cromosómicas presentaron señal de hibridación débil y uniforme (Figuras 11 A-F y 12 A-B).

Por último, se hibridaron células meióticas (en interfase y metafase I) del híbrido F1 *Zea luxurians* x *Zea perennis* con ADN genómico total de *Zea luxurians* marcado con digoxigenina y utilizando como bloqueo ADN genómico total no marcado de *Zea perennis*. Este experimento permitió diferenciar a los cromosomas de *Zea luxurians* y de *Zea perennis* en las configuraciones meióticas del híbrido F1 ya que los cromosomas de *Zea luxurians* presentan una señal

fluorescente coincidente con los "knobs", la cual no se observa en los cromosomas de *Zea perennis* (Figuras 10 C-J).

Al realizar un experimento de GISH utilizando como sonda el ADN genómico de *Zea luxurians* marcado con digoxigenina y ADN no marcado de *Zea diploperennis* como bloqueante, se observaron las regiones subteloméricas con fuertes señales de hibridación, mientras que en el resto de los cromosomas se observaron señales variables de hibridación (Figuras 12 C y D).

2.3. Experimentos de GISH: análisis de las afinidades genómicas entre especies de la sección *Zea*

2.3.1. *Zea mays ssp. mays* y *Zea mays ssp. parviglumis.*

En un primer experimento de GISH, el ADN genómico total de *Zea mays* ssp. *parviglumis* fue utilizado como sonda sobre células mitóticas de maíz. Se observaron señales de hibridación de fuertes a moderadas a lo largo de todos los cromosomas (Figuras 13 A-G). Las regiones centroméricas y próximas al organizador nucleolar no presentaron señales de hibridación (Figuras 13 A-G), por lo que se infiere que estas regiones cromosómicas presentan secuencias de ADN repetido que se encuentran en baja frecuencia o ausentes en el genoma de *Zea mays* ssp. *parviglumis*.

Para mejorar la discriminación entre las regiones cromosómicas que mostraron señales variables de hibridación, se realizó un segundo experimento de GISH en condiciones de alta astringencia y se aplicaron procedimientos de bloqueos genómicos. Para ello se utilizó como bloqueante el ADN genómico total no marcado de *Zea mays* ssp. *parviglumis* sobre los cromosomas de maíz, y se hibridó con el ADN genómico total del mismo maíz marcado con digoxigenina. Como resultado se detectaron señales de hibridación dispersas a lo largo de todos los cromosomas (Figuras 14 A-F) salvo las bandas DAPI +

correspondientes a las regiones heterocromáticas llamadas "knobs" que fueron bloqueadas, ya que no se observan señales de hibridación sobre ellas (Figuras 14 A-F). Cabe aclarar en este punto que una de las dificultades del bloqueo es la de encontrar la proporción eficaz de ADN bloqueante no marcado en relación al ADN marcado, por lo que es deseable tener secuencias "control" o "testigo" que nos garanticen que el experimento funcione correctamente. En este caso las secuencias control son las bandas DAPI + de maíz, las cuales contienen familias de secuencias repetidas en *tandem* como la llamada "180-pb" (Dennis y Peackock, 1984) o la TR-1 (que también está presente en *Zea mays* ssp. *parviglumis*, como lo demuestran nuestros estudios de FISH, ver resultados, sección 3.2). La ausencia de hibridación en estas regiones es entonces garantía de que la proporción utilizada 30:1 (ADN bloqueante: sonda marcada) ha sido suficiente para que las secuencias homólogas fueran bloqueadas correctamente. Por lo tanto, las zonas que sí muestran señal de hibridación pueden interpretarse como zonas cromosómicas de maíz constituidas por secuencias que no fueron bloqueadas con las secuencias provenientes del ADN de *Zea mays* ssp. *parviglumis,* y que por lo tanto diferencian ambas subespecies. También es importante notar que las regiones cercanas al organizador nucleolar de maíz que no han mostrado homología con *Zea mays* ssp. *parviglumis* en el experimento anterior (Figuras 13 A-G) presentan ahora señal de hibridación intensa, confirmando que en esas regiones están localizadas secuencias de maíz que no son homólogas con las de *Zea mays* ssp. *parviglumis* (Figuras 14 A-F). Además, en este último experimento se puedo observar que dos cromosomas prácticamente carecen de señales de hibridación (Figuras 14 A-F) lo que indica que este par cromosómico posee mayor afinidad con el genoma de *Zea mays* ssp. *parviglumis* que el resto del complemento cromosómico.

Con el propósito de obtener nuevas evidencias que apoyen los resultados antes mencionados, se realizaron nuevos experimentos de GISH hibridando, en este caso, metafases mitóticas de *Zea mays* ssp. *parviglumis* con el ADN

genómico total de *Zea mays* ssp. *parviglumis* marcado con digoxigenina y utilizando como bloqueante el ADN genómico total no marcado de una línea de maíz "knobless" (que no posee las secuencias de los "knobs"). En este experimento se observaron tres niveles diferentes de hibridación: muy débil, intermedio e intenso (Figura 15 A-F), los cuales corresponderían a zonas de alta, baja y nula homología, respectivamente, entre ambas subespecies. Debido a que el agente bloqueante utilizado fue el ADN genómico de una línea de maíz sin "knobs", las zonas hibridadas fuertemente se corresponden con las secuencias "knobs" las cuales están ausentes en este maíz (Figuras 15 A-F). Este hecho fue tomado, en este, caso como prueba positiva de que el experimento de bloqueo genómico se realizó en forma adecuada.

Este patrón de hibridación se representó mediante un mapeo de bandas GISH en el Idiograma de la figura 16. A partir de este Idiograma se puede estimar que las regiones cromosómicas de *Zea mays* ssp. *parviglumis* que muestran señales intermedias de hibridación representan aproximadamente el 70% del largo cromosómico total, por lo tanto, los cromosomas de *Zea mays* ssp. *parviglumis* contendrían en estas zonas secuencias repetidas que *Zea mays* ssp. *mays* no posee en su genoma.

2.3.2. *Zea mays ssp. mays* y *Zea mays ssp. mexicana.*

Se hibridaron metafases mitóticas de maíz usando como sonda ADN genómico total de *Zea mays* ssp. *mexicana* marcado con biotina. Se observaron señales de hibridación a lo largo de todos los cromosomas lo cual indica una alta homología entre estas dos subespecies (Figuras 17 A-F). Sin embargo, en algunas zonas centroméricas y las cercanas al organizador nucleolar la señal de hibridación es débil o ausente, revelando que en estas zonas el maíz posee menos secuencias homólogas con el genoma de *Zea mays* ssp. *mexicana.* Este experimento arrojó resultados similares a los descriptos cuando se hibridaron cromosomas de maíz con ADN genómico total marcado de *Zea mays* ssp.

parviglumis (Figuras 13 A-F). Es interesante observar además, que los cromosomas B de la raza de maíz utilizada como blanco en este experimento presentan señal de hibridación similar al resto de los cromosomas, al hibridar con ADN de *Zea mays* ssp. *mexicana,* que no posee cromosomas B (Figuras 17 A-F).

El experimento opuesto fue realizado utilizando como sonda ADN genómico total de maíz marcado con digoxigenina para ser hibridado sobre cromosomas metafásicos de *Zea mays* ssp. *mexicana.* En este caso se observaron señales de hibridación dispersas a lo largo de todos los cromosomas a excepción de las zonas DAPI + de *Zea mays* ssp. *mexicana* donde no se observan conspicuas señales de hibridación (Figuras 18 A-D). Es decir que si bien las señales de hibridación son conspicuas, éstas no se distribuyen de manera uniforme sobre los cromosomas de *Zea mays* ssp. *mexicana* lo que sugiere que existen secuencias de esta especie que no posee el maíz. Si bien este resultado no era el esperado de acuerdo al experimento anterior, tampoco es improbable e indica que si bien maíz tiene una gran homología con *Zea mays* ssp. *mexicana*, esta última subespecie tiene además otras secuencias que no comparte con maíz, un hecho nada sorprendente si se tiene en cuenta el origen híbrido de muchas especies, y la existencia de introgresión

2.3.3. *Zea mays ssp. mays* y *Zea mays ssp. huehuetenanguensis*

Se realizaron experimentos de GISH utilizando como sonda ADN genómico total de *Zea mays* ssp. *huehuetenanguensis* marcado con digoxigenina, la cual fue hibridada sobre metafases mitóticas de maíz (individuo con 2 cromosomas B). En este estudio se observó que además de no haber señales de hibridación en las regiones centroméricas y próximas al organizador nucleolar, como sucedía al hibridar el ADN de *Zea mays* ssp. *parviglumis* y de *Zea mays* ssp. *mexicana* sobre cromosomas de maíz, existen muchas otras regiones cromosómicas que presentan señales de hibridación de intensidad moderada o nula (Figuras 19 A-D). Al medir estas regiones sobre varias células, se observó que representan

aproximadamente el 24% y 44% de la longitud cromosómica total, respectivamente. Esto indica que en estas regiones existirían secuencias de maíz que no son homólogas con el genoma de *Zea mays* ssp. *huehuetenanguensis*. Los resultados mencionados sugieren que existe un alto grado de divergencia genómica entre el maíz y *Zea mays* ssp. *huehuetenanguensis*, el cual es mayor al observado con las otras dos subespecies de *Zea mays*.

Es importante notar también, que los cromosomas B del maíz utilizado como blanco presentaron señal a lo largo de todo el cromosoma excepto en una región terminal, al ser hibridados con la sonda de ADN genómico de *Zea mays* ssp. *huehuetenanguensis* el cual no posee cromosomas B (Figuras 19 A-D). Este resultado es similar al observado al hibridar cromosomas de maíz (con Bs) con el ADN marcado de *Zea mays* ssp. *mexicana* (Figuras 17 A-F).

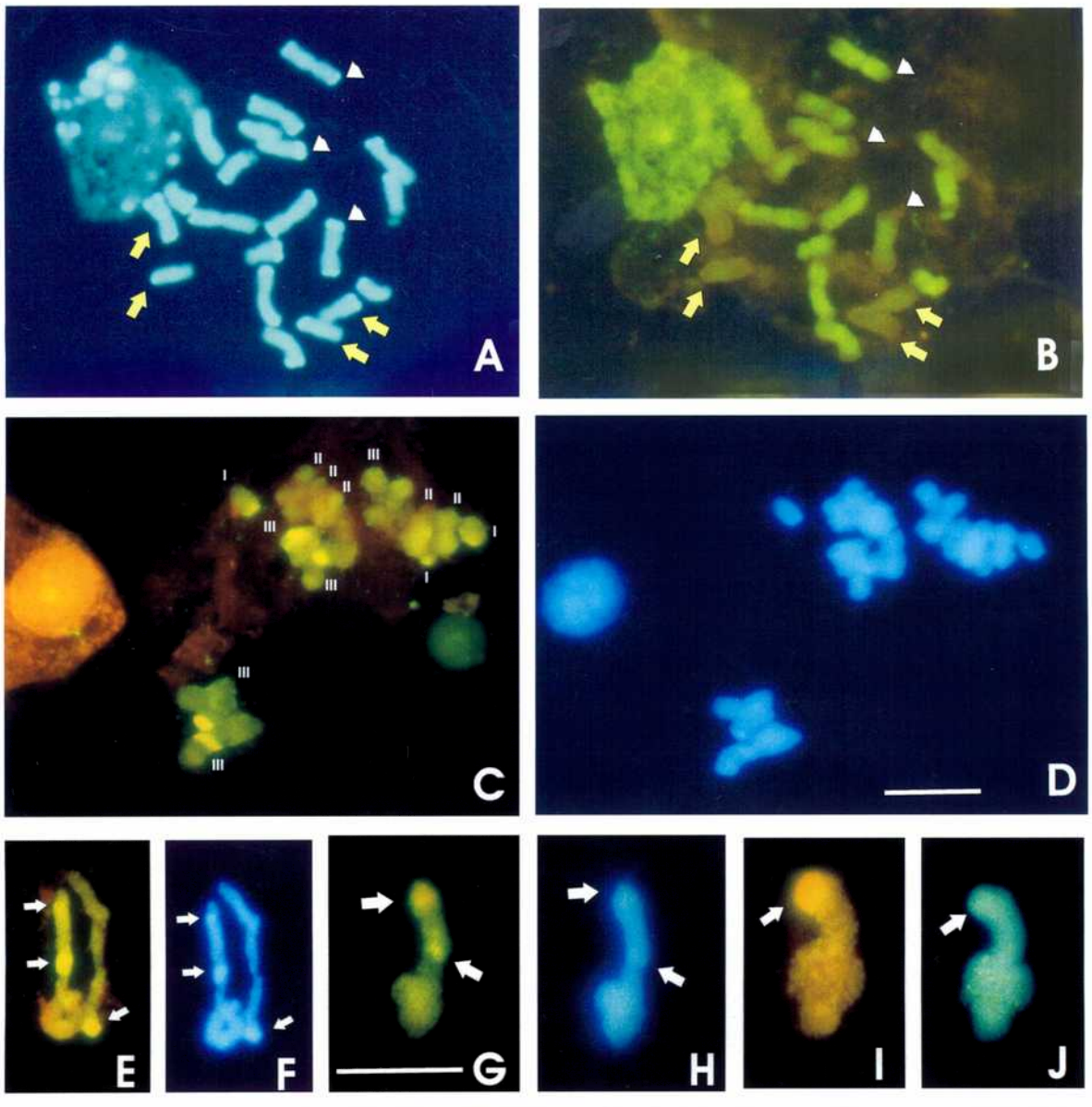


Figura 10: A-B: Metafase mitótica de *Zea luxurians*. **A:** GISH utilizando como sonda ADN genómico de *Zea perennis* marcado con digoxigenina y revelado con antidigoxigenina-FITC. Las flechas amarillas indican cromosomas con muy baja señal de hibridación, las puntas de flecha muestran las zonas teloméricas (DAPI +) que no presentan señal de hibridación. **C-J**: Cromosomas meióticos del híbrido F1 *Zea luxurians* x *Zea perennis* (2n=30) **C, E, G, e I**: GISH utilizando como sonda ADN genómico de *Zea luxurians* marcado con digoxigenina (revelado con antidigoxigenina-FITC), y bloqueando con ADN genómico no marcado de *Zea perennis*. **C:** Metafase I; se indican los trivalentes (III), bivalentes (II) y univalentes (I). **E, G e I:** detalle de trivalentes de tipo "fry-pan". Las flechas indican las zonas heterocromáticas (DAPI +) con intensa señal de hibridación. **A, D, F, H y J**: Contratinción con DAPI. Barra= 10*u*m.

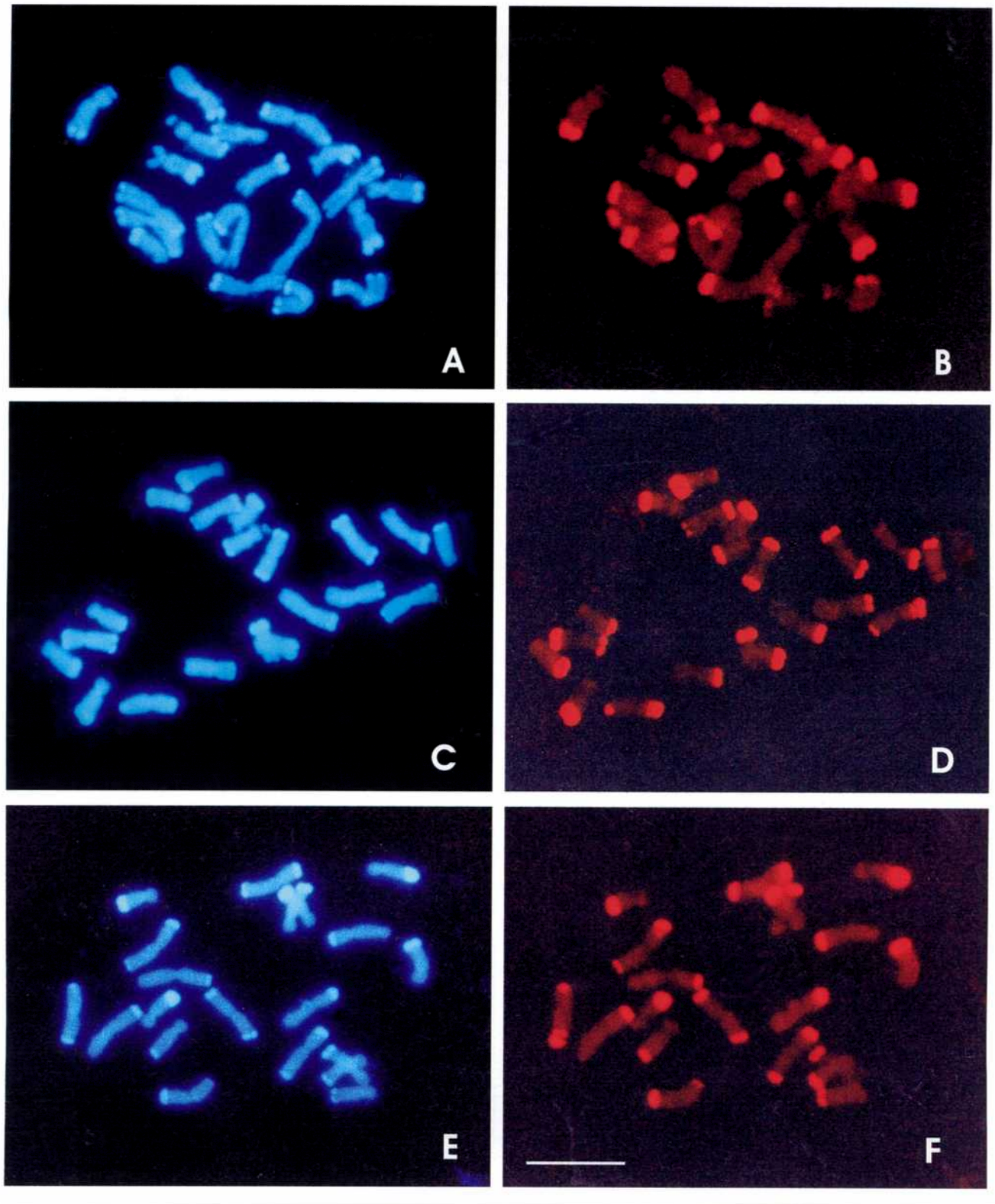


Figura 11: A-F: Metafases mitóticas de *Zea luxurians*. **B, D y F:** Hibridación *in situ* usando como sonda ADN genómico total de *Zea luxurians* marcado con biotina (revelado con Cy3) y bloqueando con ADN genómico no marcado de *Zea perennis*. Las regiones teloméricas que presentan fuertes señales de hibridación corresponden a las zonas DAPI + de *Zea luxurians*. **A, C y E**: Contratinción con DAPI. Barra= 10 *u*m.

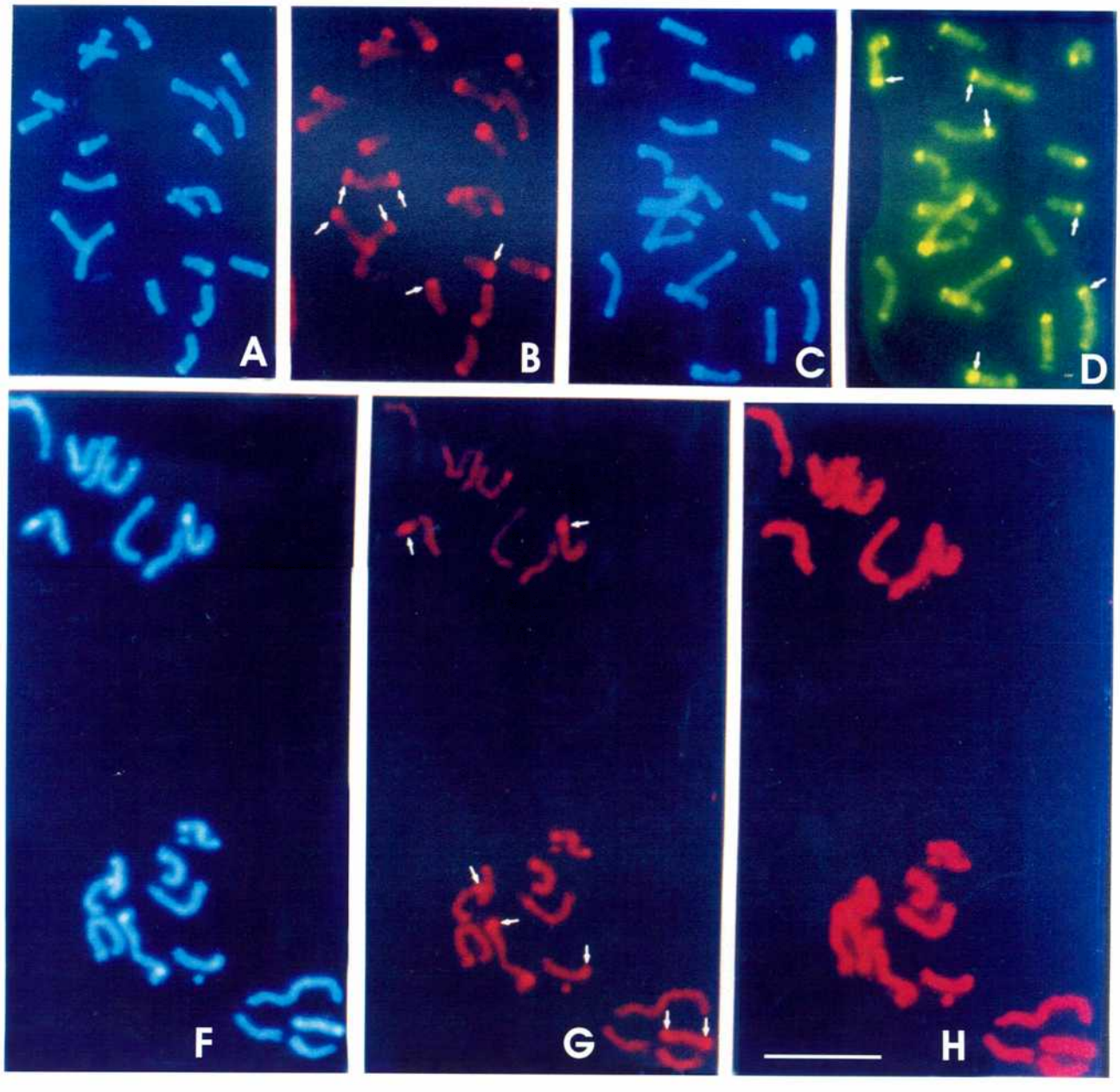


Figura 12: A-B: Metafase mitótica de *Zea luxurians*. **B:** GISH utilizando como sonda ADN genómico de *Zea luxurians* marcado con biotina (detectado con Cy3) y bloqueando con ADN genómico no marcado de *Zea perennis.* Las flechas señalan las zonas teloméricas que presentan fuertes señales de hibridación. **D:** GISH utilizando como sonda ADN genómico de *Zea luxurians* marcado con digoxigenina (detectado con antidigoxigenina-FITC) y bloqueando con ADN genómico no marcado de *Zea diploperennis*. Las flechas indican las zonas que no fueron bloqueadas. **F-H:** Metafase mitótica de *Zea mays* ssp. *mays;* **G:** GISH usando como sonda ADN genómico de *Zea luxurians* marcado con biotina y detectado con Cy3. Las flechas señalan las zonas teloméricas que presentan fuertes señales de hibridación. **H:** Rehibridación de **G** utilizando como sonda ADN genómico de *Zea diploperennis* marcado con biotina y detectado con Cy3. **A, C y F:** Contratinción con DAPI. Barra= 10 *u*m.

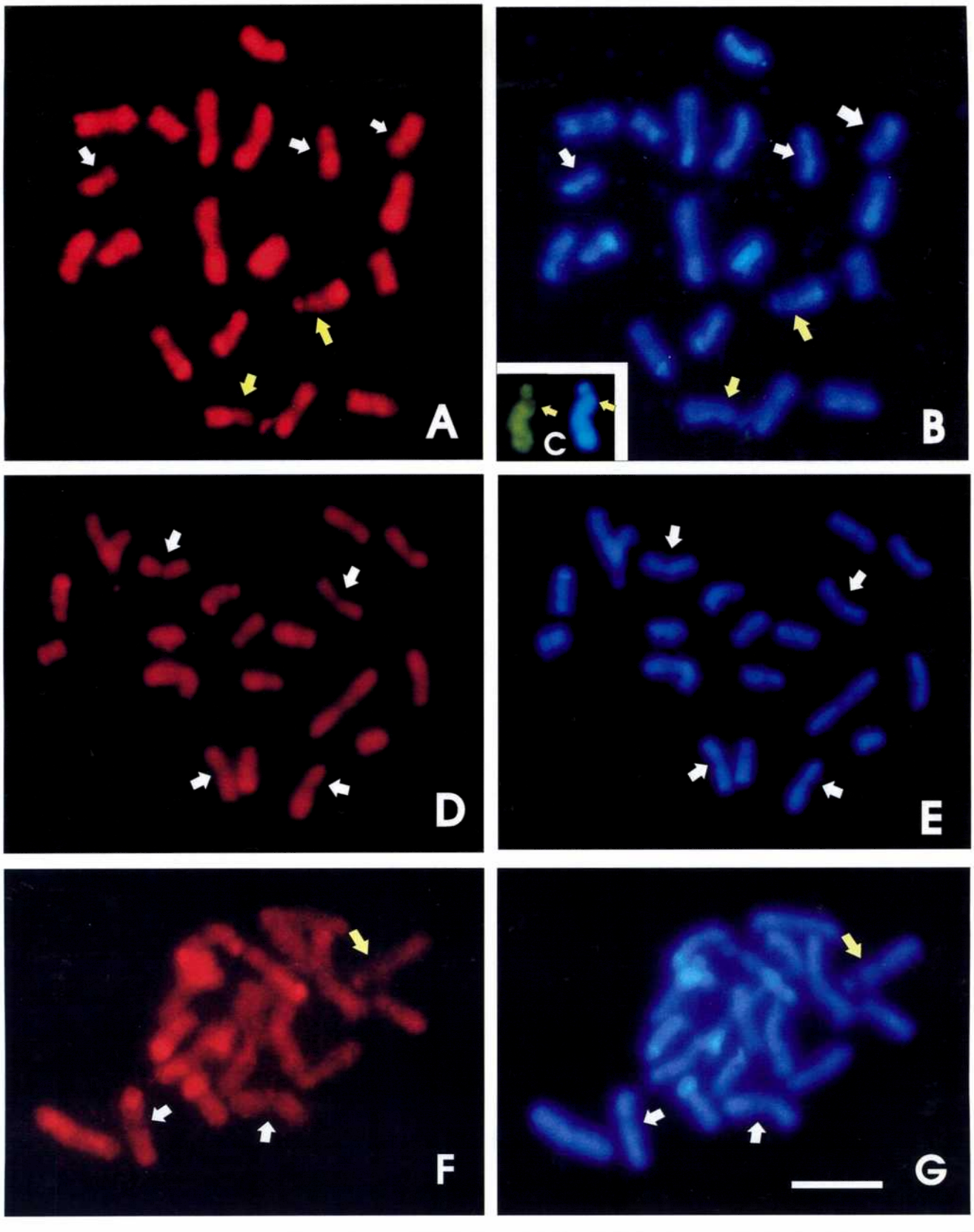


Figura 13: A-G: Metafases mitóticas de *Zea mays* ssp. *mays*. **A, D y F:** Hibridación *in situ* usando como sonda ADN genómico total de *Zea mays* ssp. *parviglumis* marcado con biotina y revelado con Cy3. **C:** A la izquierda, cromosoma 6 de *Zea mays* ssp. *mays* hibridado con ADN genómico de *Zea mays* ssp. *parviglumis* marcado con digoxigenina y detectado con antidigoxigenina-FITC; a la derecha, contratinción con DAPI. **B, E y G:** Contratinción con DAPI. Las flechas blancas indican algunas de las regiones centroméricas con débil o nula señal de hibridación. Las flechas amarillas señalan las zonas próximas al organizador nucleolar que presentan menor señal de hibridación. Barra= 10 μm.

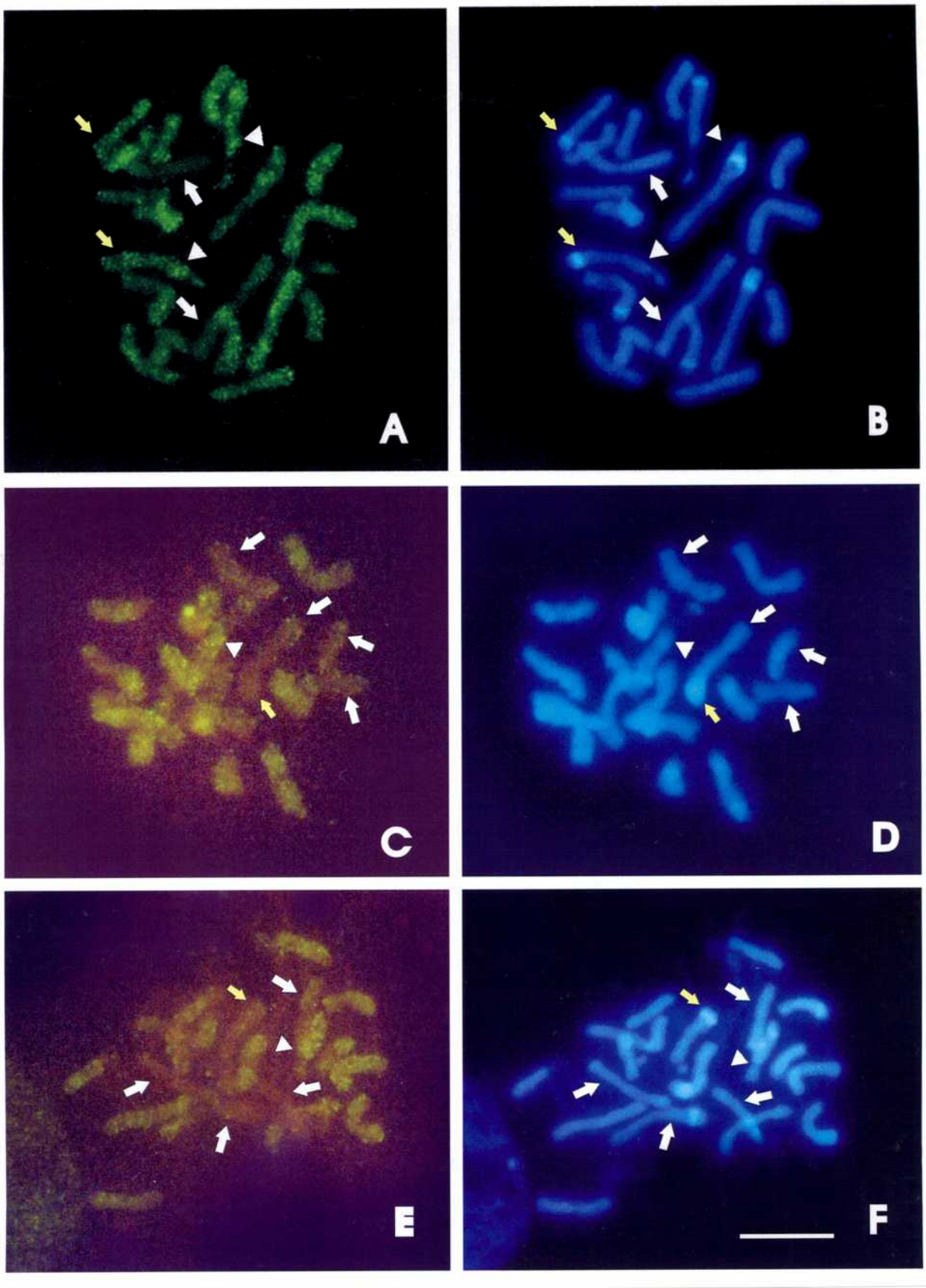


Figura 14: A-F: Metafases mitóticas de *Zea mays* ssp. *mays*. **A, C y D:** Hibridación *in situ* utilizando como sonda ADN genómico de *Zea mays* ssp. *mays* marcado con digoxigenina (revelado con antidigoxigenina-FITC) y bloqueando con ADN genómico no marcado de *Zea mays* ssp. *parviglumis*. **B, D y F:** Contratinción con DAPI. Las flechas amarillas indican algunas de las zonas "knobs" que fueron bloqueados con el ADN genómico de *Zea mays* ssp. *parviglumis*. Las flechas blancas indican un par de cromosomas con señales débiles de hibridación. Las puntas de flechas muestran las zonas cercanas al organizador nucleolar con fuertes señales de hibridación. Barra= 10 µm.

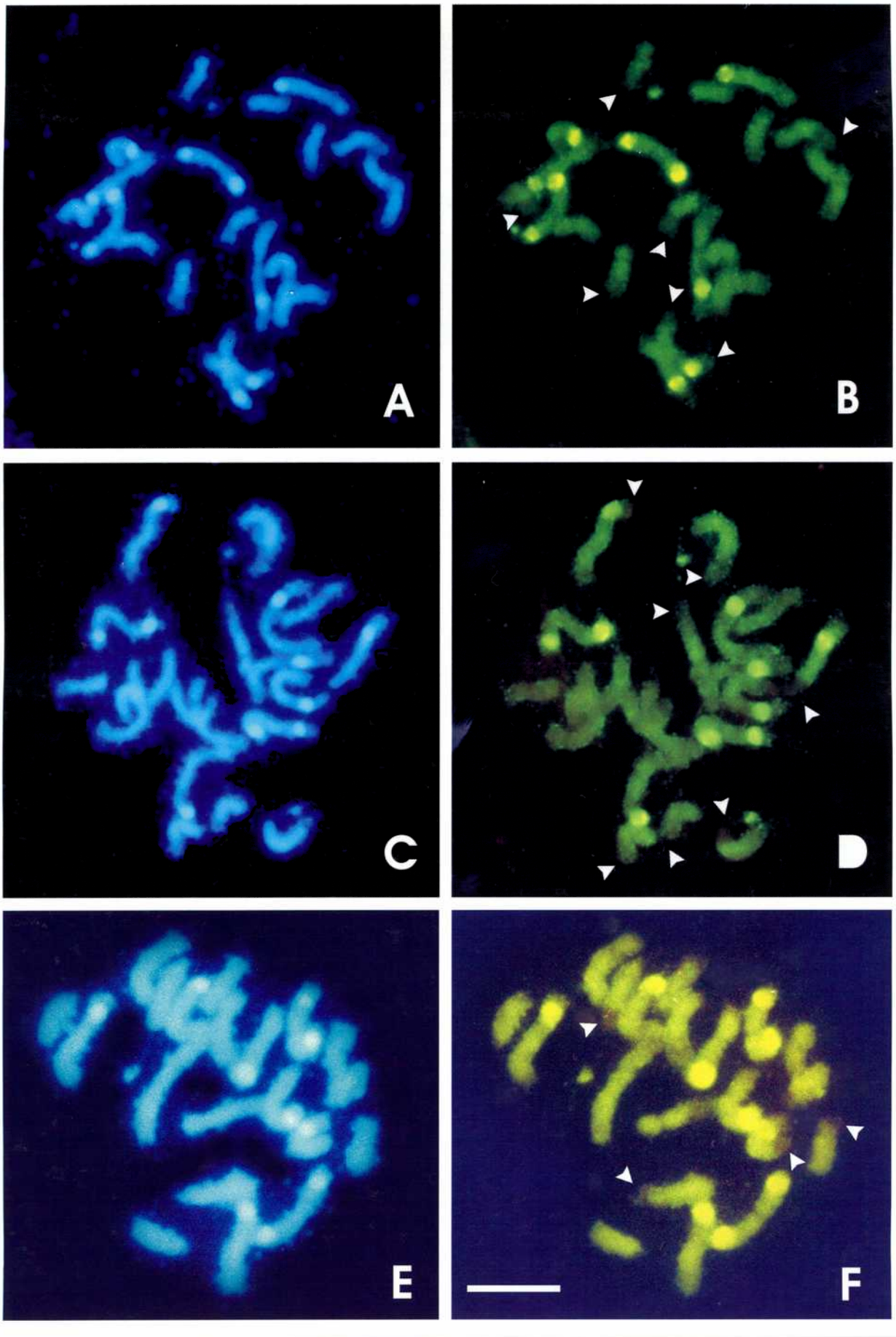
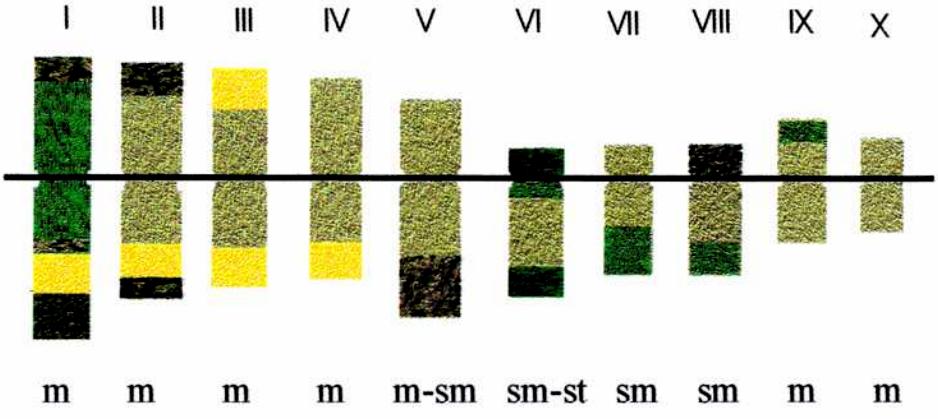


Figura 15: Metafases mitóticas de *Zea mays* ssp. *parviglumis*. **B, D y F:** Hibridación *in situ* utilizando como sonda ADN genómico de *Zea mays* ssp. *parviglumis* marcado con digoxigenina (revelado con antidigoxigenina-FITC) y bloqueando con ADN genómico no marcado de una línea de *Zea mays* ssp. *mays* sin "knobs" (línea Knobless). Las puntas de flecha señalan algunas de las zonas teloméricas que no muestran señal de hibridación. **A, C y E:** Contratinción con DAPI. Barra= 10 μm.



Las zonas no hibridadas corresponden a zonas no homólogas entre *Zea mays* ssp. *parviglumis* y *Zea mays* ssp. m*ays*.

Las zonas hibridadas uniformemente corresponden a zonas de menor homología con *Zea mays* ssp. *mays*.

Las zonas de hibridación no uniforme son de mayor homología con *Zea mays* ssp. *mays*.

Las zonas intensamente hibridadas corresponden a los "knobs", ya que el bloqueo se realizó con una línea de maíz sin "knobs" (línea Knobless).

Ref.: m: metacéntrico, sm:submetacéntrico y st: subtelocéntrico

Figura 16: Representación esquemática de los cromosomas de *Zea mays* ssp. *parviglumis* hibridados con ADN marcado de *Zea mays* ssp. *parviglumis* y ADN no marcado de *Zea mays* ssp. *mays* (línea Knobless) utilizado como bloqueante.

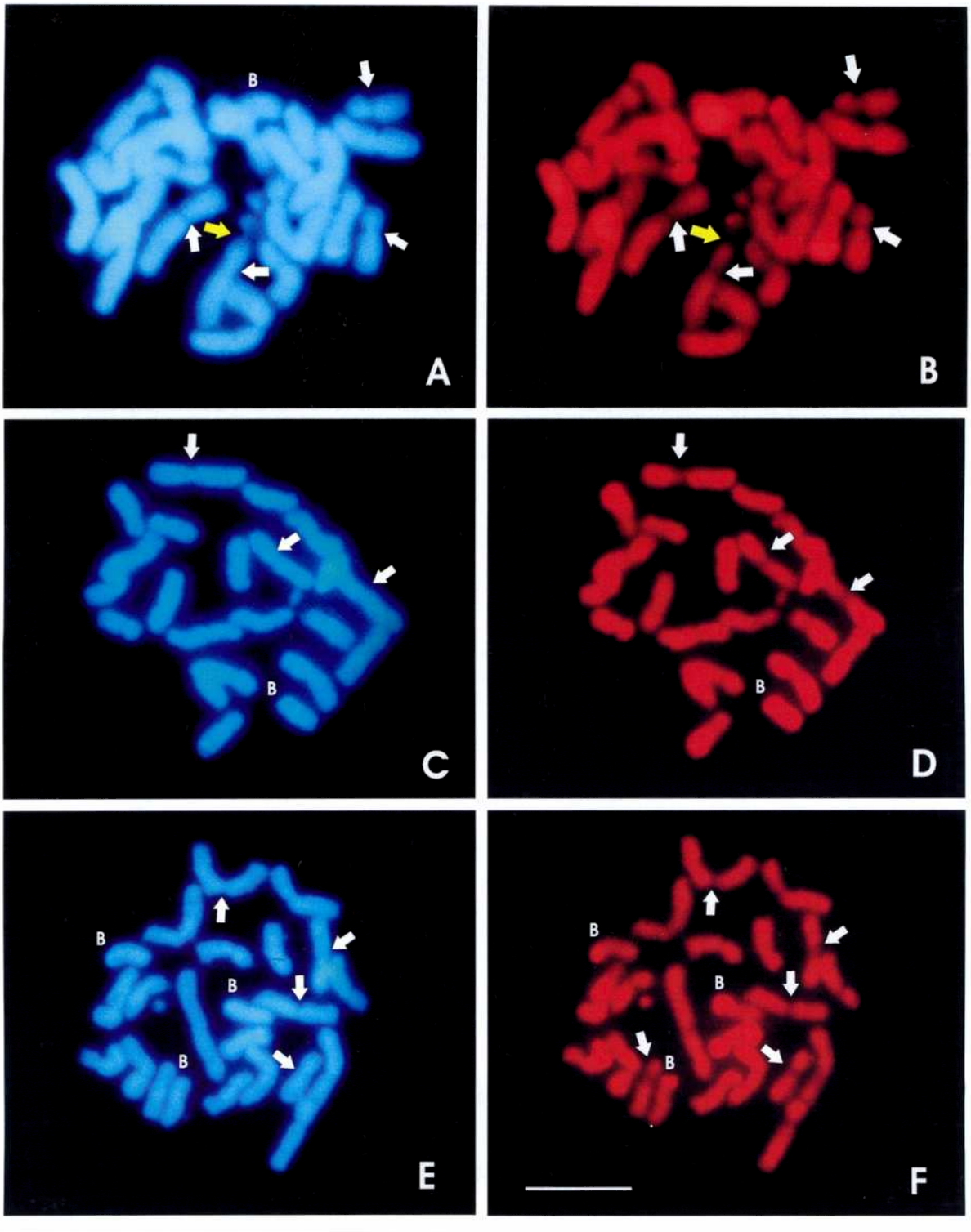


Figura 17: Metafases mitóticas de *Zea mays* ssp. *mays* (con cromosomas B). **B, D y F:** Hibridación *in situ* utilizando como sonda ADN genómico de *Zea mays* ssp. *mexicana* marcado con biotina y detectado con Cy3. **A, C y E:** Contratinción con DAPI. Las flechas blancas señalan algunas de las regiones centroméricas que no presentan señal de hibridación. Las flechas amarillas indican las zonas próximas al organizador nucleolar que muestran menor señal de hibridación. B: cromosomas B. Barra= 10 *u*m.

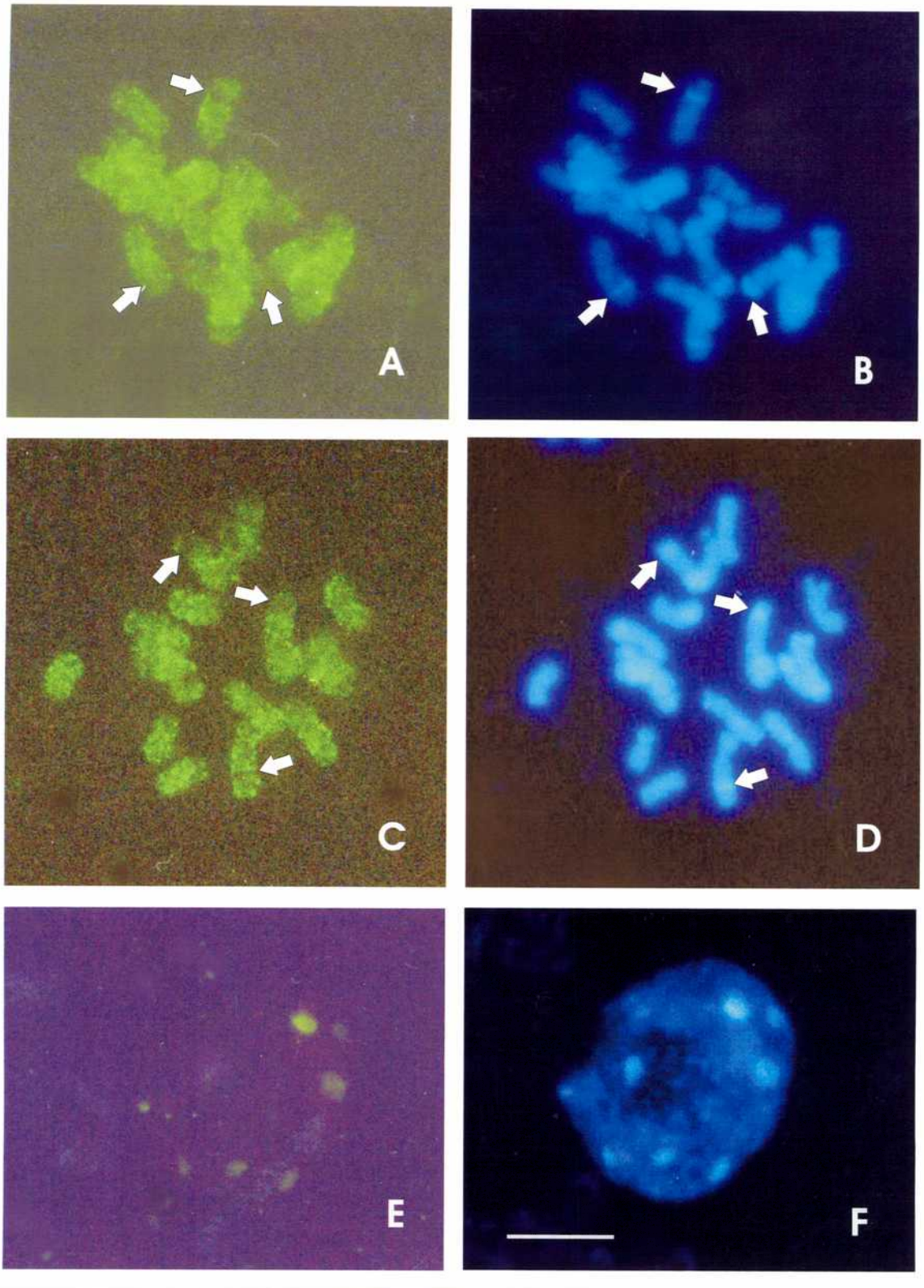


Figura 18: A-D: Metafases mitóticas de *Zea mays* ssp. *mexicana*. **A y C:** Hibridación *in situ* utilizando como sonda ADN genómico de *Zea mays* ssp. *mays* marcado con digoxigenina y revelado con antidigoxigenina-FITC. Las flechas señalan algunas de las regiones "knobs" (DAPI +) que no fueron hibridadas con el ADN genómico de *Zea mays* ssp. *mays*. **E y F:** Núcleo interfásico de *Zea mays* ssp. *mexicana*. **E:** FISH utilizando como sonda la secuencia "180-pb" del "knob" de maíz. **B, D y F:** Contratinción con DAPI. Barra= 10 *u*m.

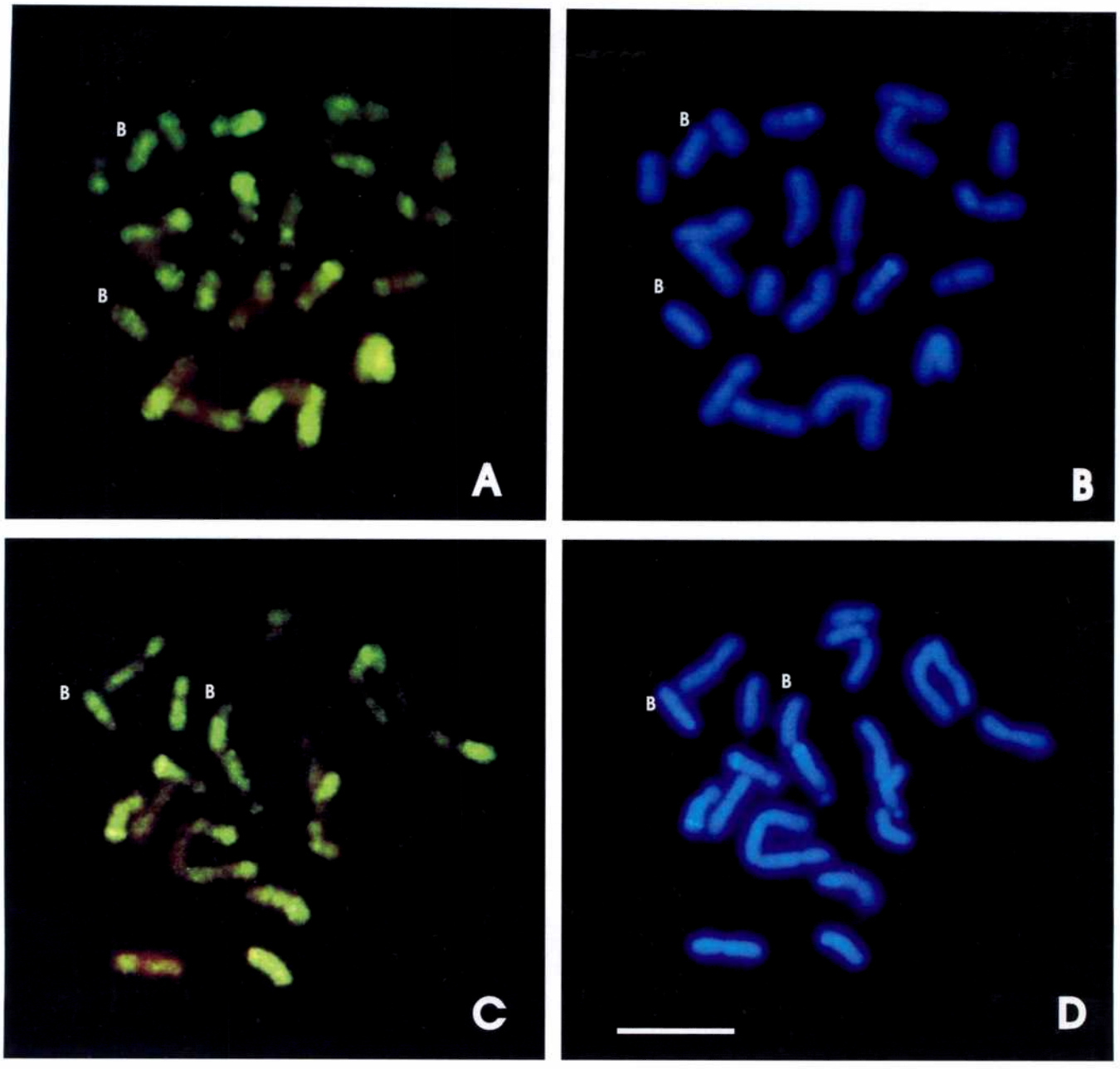


Figura 19: Metafases mitóticas de *Zea mays* ssp. *mays* (con 2 cromosomas B). **A y C:** Hibridación *in situ* utilizando como sonda ADN genómico de *Zea mays* ssp. *huehuetenanguensis* marcado con digoxigenina y detectado con antidigoxigenina-FICT. **B y D:** Contratinción con DAPI. B: cromosomas B. Barra= 10*u*m.

2.4. Experimentos de GISH: análisis de las afinidades genómicas entre especies de la sección *Zea* y la sección Luxuriantes

2.4.1. *Zea perennis* y *Zea mays ssp.mays*

Se realizaron experimentos de GISH donde se utilizó como sonda el ADN genómico total de *Zea perennis* marcado con digoxigenina hibridada sobre cromosomas metafásicos de maíz. Aquí se observó señal de hibridación dispersa sobre todos los cromosomas a excepción de 4 de ellos que muestran mucha menor señal de hibridación (Figuras 20 A-F). Este resultado indicaría que estos cromosomas de maíz están compuestos por un gran número de secuencias que no presentan homología molecular con las que componen el genoma de *Zea perennis*. Con el fin de identificar a estos dos pares de cromosomas se realizó el idiograma que representa al cariotipo de maíz y se observó que se trata de los pares metacéntricos I y III (Figura 21).

En estos experimentos también se observó que los knobs heterocromáticos del maíz (bandas DAPI +) no muestran señal de hibridación con el ADN genómico de *Zea perennis* (Figuras 20 A-F).

En otro experimento de GISH se aplicó como bloqueo el ADN genómico total no marcado de *Zea perennis* sobre células de maíz, las cuales fueron hibridadas con el ADN genómico total del mismo maíz marcado con digoxigenina (Figuras 22 A-D). En esta oportunidad pudieron observarse señales moderadas de hibridación sobre todos los cromosomas a excepción de las zonas knobs (DAPI +) que presentaron señales intensas de hibridación (Figuras 22 A-D).

Por otro lado, se hibridaron los cromosomas de *Zea perennis* con el ADN genómico total de *Zea mays* ssp. *mays* marcado con digoxigenina, y se observaron señales de hibridación dispersas a lo largo de todos los cromosomas, sin que ninguno de ellos presentara un patrón de hibridación diferencial (Figuras 23 A- D).

En un último experimento de GISH se realizó el mismo bloqueo que el anterior pero en células del híbrido F1 *Zea mays* ssp. *mays* x *Zea perennis* (2n=30). Este estudio permitió discriminar a los cromosomas de las especies parentales y conocer la naturaleza del apareamiento meiótico. Se observó que los univalentes pertenecen a maíz, porque mostraron fuertes señales de hibridación, y mientras que los bivalentes pertenecen a *Zea perennis*, porque mostraron señales débiles de hibridación (Figuras 24 B y C).

2.4.2.*Zea luxurians* y *Zea mays ssp.mays*

Con el objeto de conocer las afinidades moleculares entre el maíz y *Zea luxurians* se realizó un experimento de GISH sobre cromosomas de *Zea mays ssp. mays* utilizando como sonda ADN genómico de *Zea luxurians* marcado con biotina. Como resultado se observaron fuertes señales de hibridación en las zonas de los "knobs" (DAPI +) mientras que en el resto de las regiones cromosómicas la hibridación fue más moderada (Figuras 12 F y G). Esto indica que la homología molecular que existe entre estas dos especies no se distribuye uniformemente los cromosomas.

2.4.3.*Zea diploperennis* y *Zea mays ssp. mays*

Para observar si la homología molecular entre *Zea diploperennis* y el maíz es similar a la que éste posee con *Zea luxurians*, se realizó un experimento de GISH utilizando la misma célula blanco del experimento anterior. Para ello se lavó el preparado para luego re-hibridarlo con el ADN genómico de *Zea diploperennis* marcado con biotina. A diferencia de lo observado en el experimento anterior (Figuras 12 F y G) todos los cromosomas de maíz presentaron señales de hibridación fuertes y homogéneas, sin que ningún cromosoma o región

cromosomica presente señales de hibridación diferenciales (Figuras 12 F y H). Estos resultados sugieren que la afinidad entre *Zea diploperennis* y el maíz es mayor que la que este último posee con *Zea luxurians.*

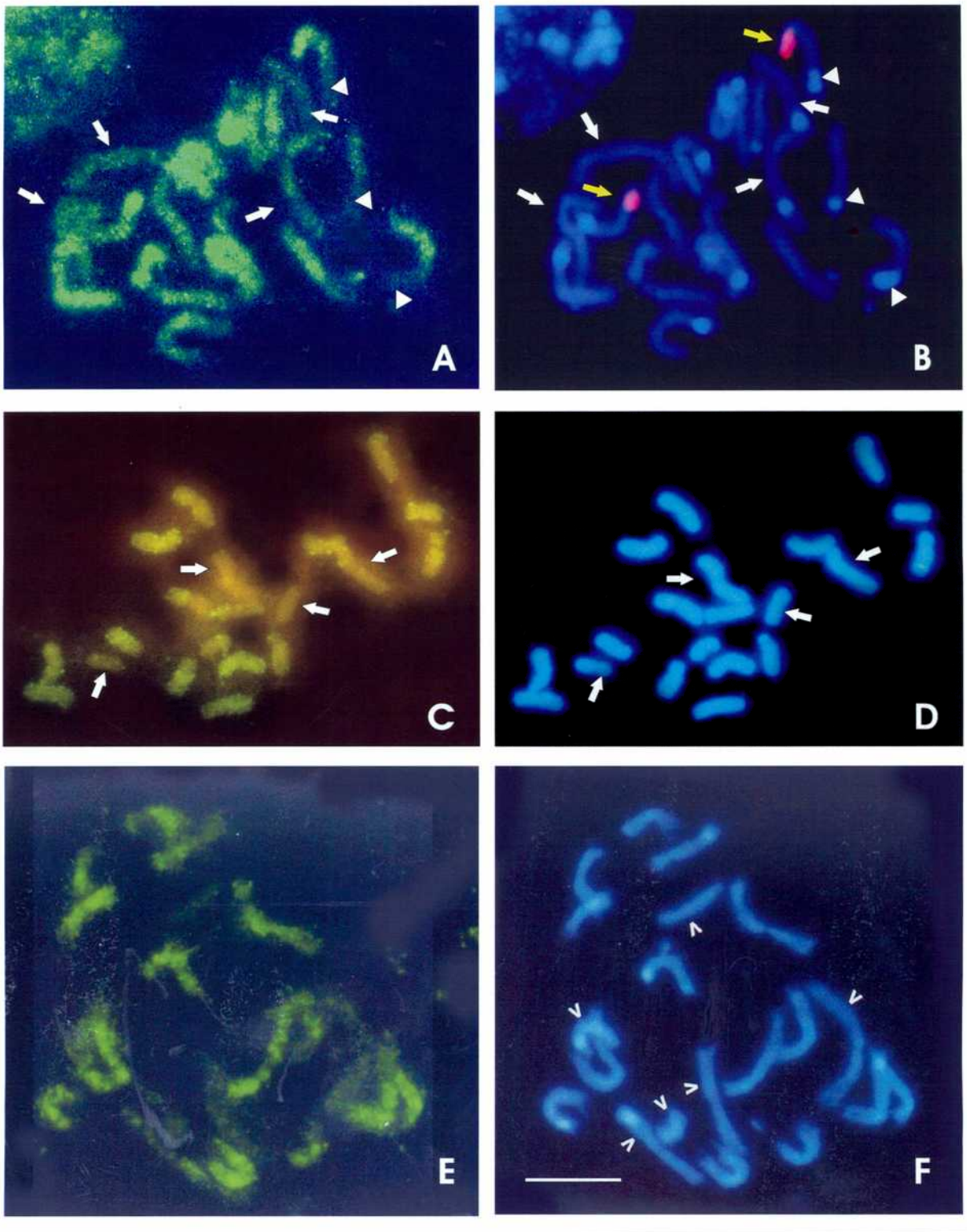


Figura 20: Cromosomas mitóticos de *Zea mays* ssp. *mays*. **A, C y E:** Hibridación *in situ* utilizando como sonda ADN genómico de *Zea perennis* marcado con digoxigenina y detectado con antidigoxigenina-FITC. **B:** FISH usando la sonda pTa794 (secuencia ribosomal 5s de trigo) marcada con biotina y detectada con Cy3; su hibridación se señala con flechas amarillas. **B, D y F:** Contratinción con DAPI. Las flechas blancas indican los cromosomas con menor señal de hibridación. Las puntas de flecha muestran algunos de los "knobs" de maíz (bandas DAPI +) que no hibridan con el ADN genómico de *Zea perennis*. Barra= 10 *u*m.

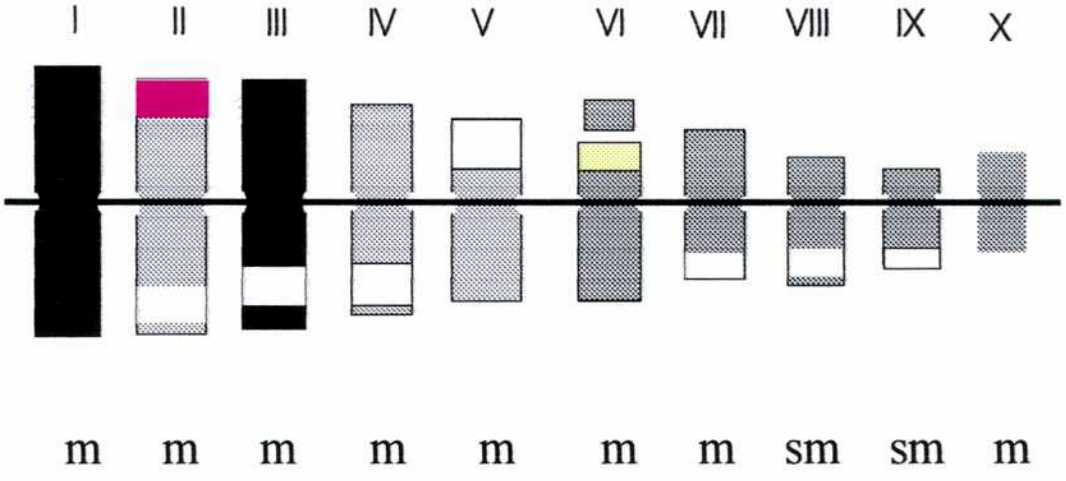


Figura 21: Idiograma de *Zea mays* ssp. *mays* (cultivar 6482) mostrando que los pares de cromosomas I y II son los que presentan menor homología molecular con *Zea perennis* (negro). Las bandas blancas indican la ubicación de los knobs. La marca rosada muestra la ubicación de la secuencia ribosomal 5s (pTa794). La marca verde indica la ubicación de la secuencia ribosomal 45s (pTa71).

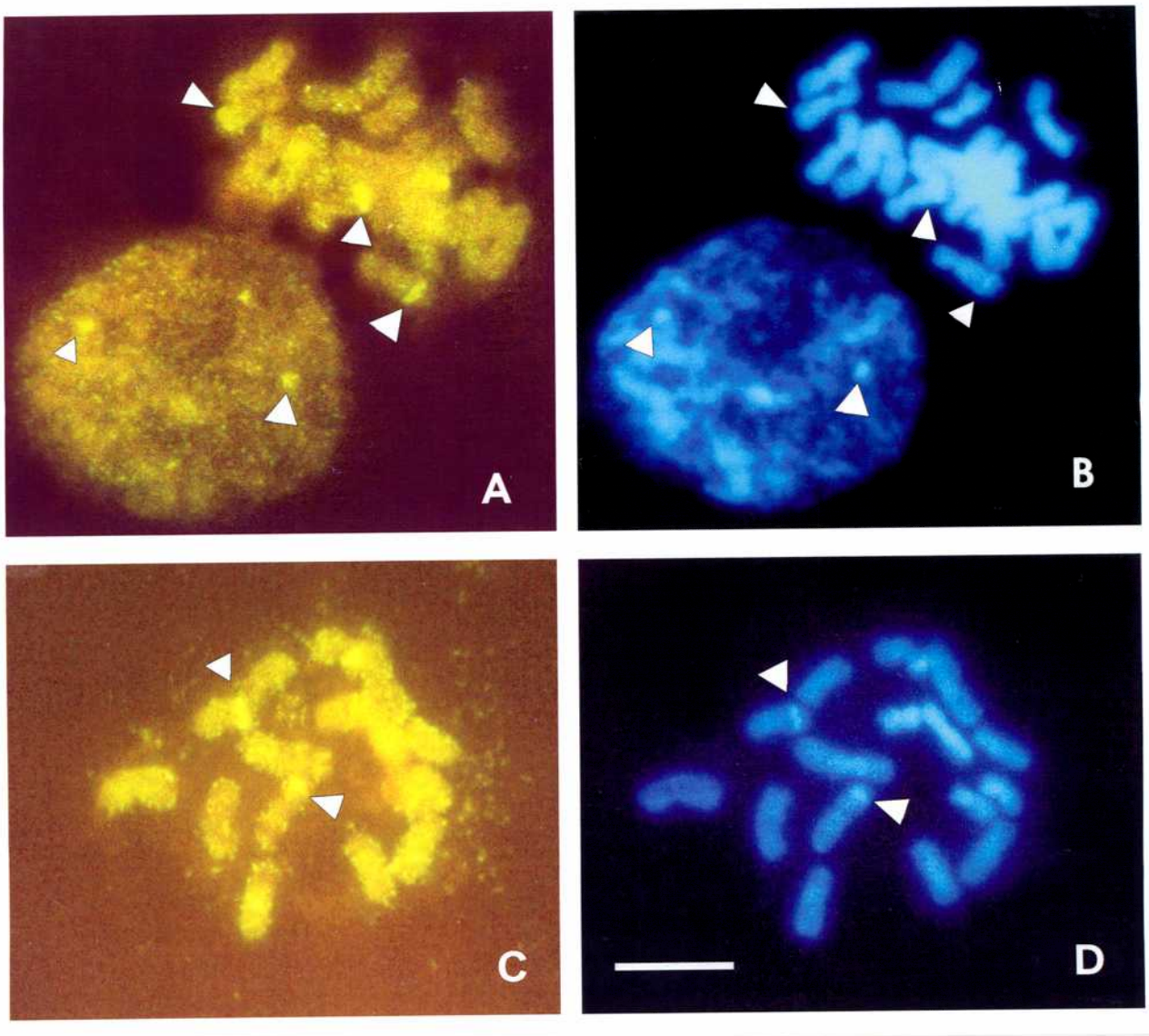


Figura 22: A-D: Metafases mitóticas y núcleo interfásico de *Zea mays* ssp. *mays*. **A y C:** Hibridación *in situ* utilizando bloqueo de ADN genómico no marcado de *Zea perennis* e hibridando con ADN genómico de maíz marcado con digoxigenina y revelado con antidigoxigenina-FICT. **B y D:** Contratinción con DAPI. Las puntas de flecha muestran los "knobs" (zonas DAPI +) que no fueron bloqueados con el ADN de *Zea perennis*. Barra= 10 *u*m.

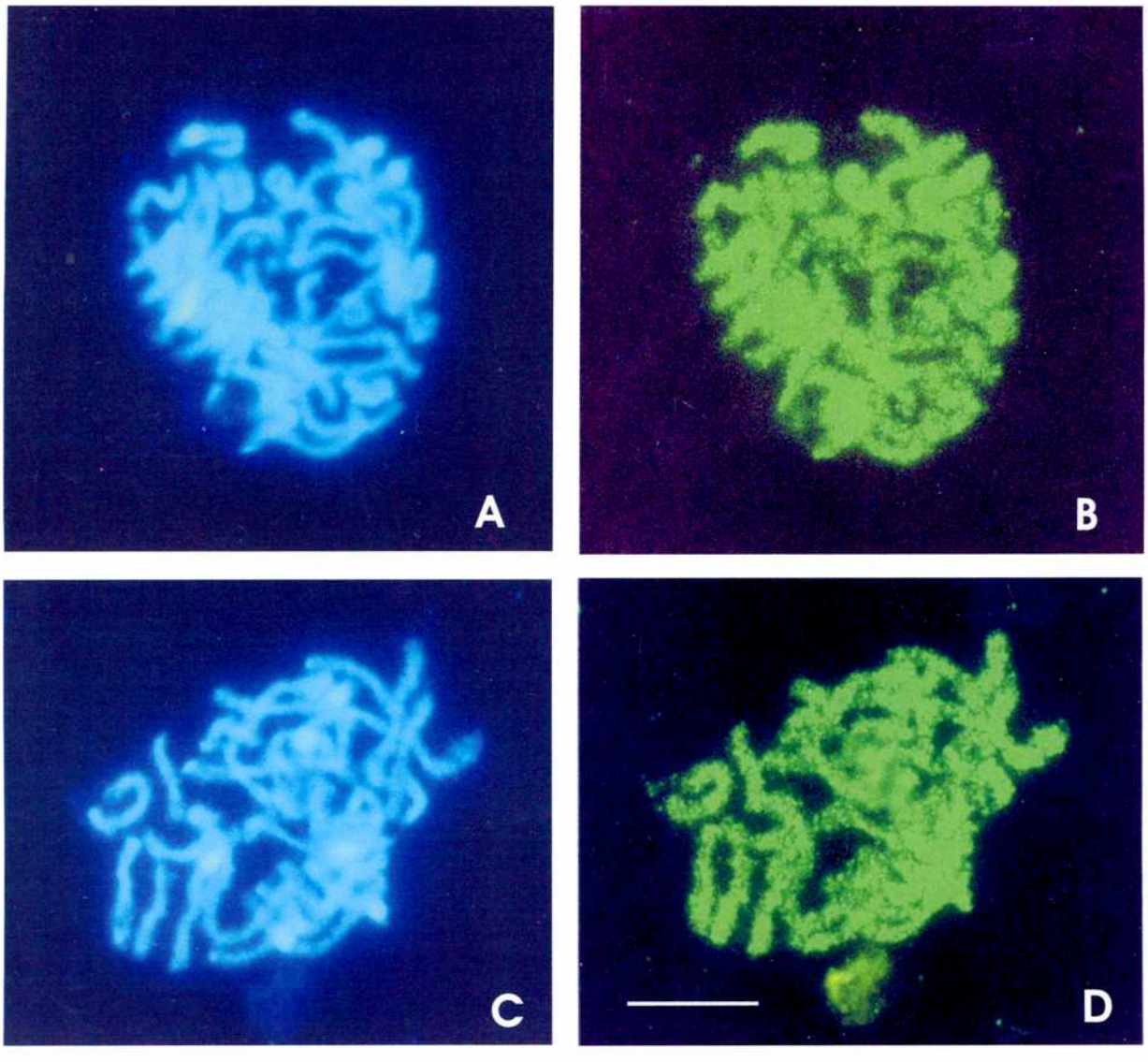


Figura 23: **A-D**: Células mitóticas de *Zea perennis*. **B y D**: GISH utilizando como sonda ADN genómico de *Zea mays ssp. mays* marcado con digoxigenina y detectado con antidigoxigenina-FITC. **A y C**: Contratinción con DAPI. Barra= 10 *u*m.

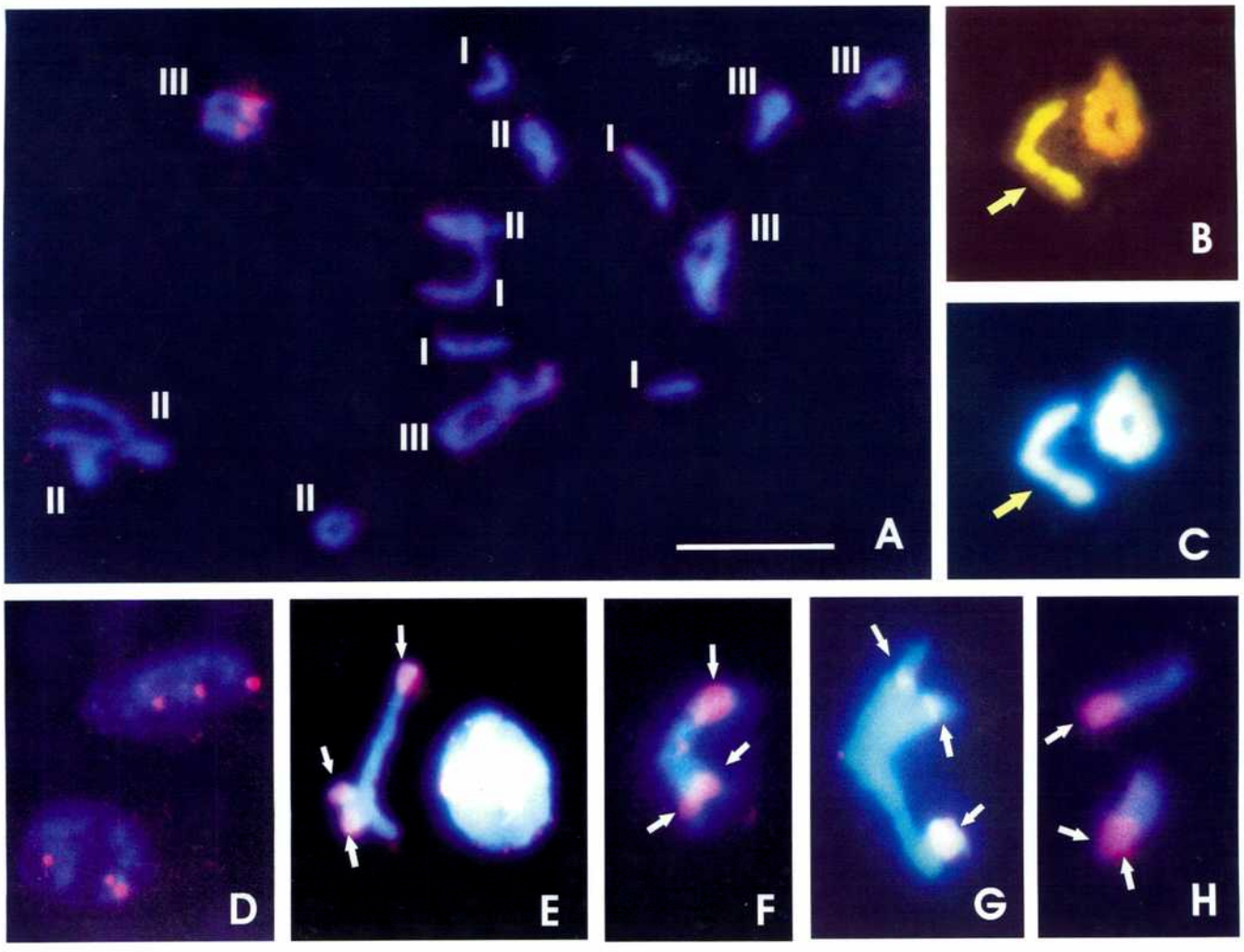


Figura 24: Cromosomas meióticos del híbrido F1 *Zea perennis* x *Zea mays* ssp. *mays*. **A:** Metafase I: 5 III + 5II + 5I. **B y C:** detalle de 1 I y 1 II:GISH utilizando como sonda el ADN genómico de *Zea mays* ssp. *mays*. y bloqueando con ADN genómico de *Zea perennis;* la flecha blanca indica un univalente con señal de hibridación. **A, D-H:** FISH utilizando como sonda la secuencia ribosomal 45s de trigo (pTa71) marcada con biotina y revelada con Cy3; **D:** núcleo interfásico; **E-G:** trivalentes; **H:** un univalente y un bivalente. Las flechas blancas indican las señales de hibridación con la sonda pTa71. Barra= 10 *u*m.

3. Experimentos de FISH: mapeo físico de secuencias específicas ribosomales y de regiones heterocromáticas

3.1. Secuencias ribosomales 5s y 45s:

La secuencia de ADN ribosomal 5s del trigo hexaplóide (pTa794) fue marcada y utilizada como sonda en experimentos de FISH con el fin de mapear su localización sobre los cromosomas de distintos taxones de *Zea*.

En un primer experimento se hibridó esta sonda marcada con biotina sobre metafases mitóticas de *Zea mays* ssp. *mays*. Dos señales conspicuas de hibridación se observaron sobre el par cromosómico 2 de maíz (Figuras 25 A-C, E, F y Figura 21). Un resultado similar arrojó el experimento de hibridación de esta misma secuencia sobre células metafásicas de *Zea mays* ssp. *parviglumis* (Figura 25 D).

En otra serie de experimentos se utilizó como sonda una secuencia de ADN ribosomal 45s del trigo hexaplóide (pTa71). En primer lugar se hibridó esta sonda marcada con biotina sobre metafases mitóticas de varias razas y líneas de *Zea mays* ssp. *mays*. En todas ellas se observaron dos señales de hibridación ubicadas sobre los brazos cortos del par cromosómico 6 (Figuras 26 A y B y Figura 21). En segundo lugar esta sonda se hibridó sobre metafases mitóticas de *Zea luxurians* y se observó el mismo resultado (Figura 26 F). En otro experimento se hibridó esta misma secuencia ribosomal marcada con digoxigenina sobre células mitóticas del autoaloctoploide *Zea perennis* y se observaron cuatro señales intensas de hibridación (Figuras 26 C-E).

Finalmente se analizó la posición de la secuencia ribosomal 45s (pTa 71) en metafases I del híbrido F1 *Zea perennis* x maíz (2n=30). La detección reveló tres señales de hibridación sobre los cromosomas del híbrido (Figuras 24 A, D-H), las que se encontraron sobre un trivalente en el 80% de las células analizadas (de un total de 50 células) (Figuras 24 A, E-G). En el 20% restante de las células

estudiadas se hallaron dos señales de hibridación sobre un bivalente y una sobre un univalente, los cuales se encontraron siempre muy cercanos unos de otros (Figura 24 H). Estos resultados estarían indicando que la secuencia de ADN ribosomal 45s está localizada en los genomas que presentan el mayor grado de apareamiento.

3.2. Secuencias Knob

Como se introdujo previamente, el maíz posee en sus "knobs" (bandas heterocromáticas DAPI +) dos familias de repeticiones en *tandem:* la llamada "180-pb" descripta por Dennis y Peacock (1984) y otra llamada TR-1, descripta por Ananiev y colaboradores (1998). La familia TR-1 presenta a su vez tres componentes (A, B y C) que se organizan de distintas formas dando lugar a repeticiones de 180 pb, al igual que en el caso de la primer familia, pero con secuencias distintas (Hsu *et al.*, 2003). Si bien se conoce que ambas familias se encuentran en los genomas de maíz y los teosintes *Zea diploperennis*, *Zea mays* ssp. *mexicana* y Zea *mays* ssp. *huehuetenanguensis* (Hsu *et al.*, 2003), no se sabe mucho sobre su localización cromosómica en estas especies y en otras del género, ni tampoco acerca de las composiciones de los distintos "knobs".

Ya hemos visto, en los experimentos de GISH, que las bandas DAPI + de las distintas especies no siempre hibridan de manera similar con las sondas genómicas de las otras especies, lo que sugiere que la naturaleza de estas bandas heterocromáticas podría ser muy diversa.

Teniendo en cuenta estos resultados se encaró un estudio de FISH utilizando sondas pertenecientes a las dos familias de secuencias repetidas localizadas en los "knobs" de maíz. Para esto, se diseñaron dos pares de cebadores específicos que amplifican ambas familias "180-pb" y TR-1 (ver Materiales y Métodos).

La tabla 3 describe las distintas amplificaciones por PCR realizadas a partir del ADN "molde" de diferentes especies. Las amplificaciones que fueron positivas para la familia "180-pb" dieron un producto de 120 pb (que se corresponde con la distancia entre los dos cebadores en una misma unidad de repetición de 180 pb, ver materiales y métodos, sección 3.6.2.1), otro producto de 300 pb (que se corresponde con la distancia entre cebadores hibridados en dos unidades de repetición contiguas) y de 480 pb (que se corresponde con la distancia entre cebadores hibridados en dos unidades de repetición que se encuentran separadas por otra unidad en el centro). Las amplificaciones que fueron positivas para la familia TR-1 dieron un producto de alrededor de 300 pb (que se corresponde con la distancia entre los dos cebadores en una unidad de repetición) y otro más grande de alrededor de 700 pb. Debido a la complejidad de esta familia (Hsu *et al.*, 2003) es difícil predecir la correspondencia de esta última banda con unidades de repetición.

La tabla 4 muestra que las amplificaciones de ambas familias no fueron exitosas en todos los casos.

Tabla 4: Resultado de la amplificación por PCR de las secuencias "180-pb" y TR-1 sobre distintos ADN "moldes".

Taxones	Secuencia Knob 180-pb	Secuencia Knob TR –1
Zea luxurians	+	-
Zea mays ssp. *parviglumis*	+	-
Zea mays ssp. *mexicana* (Raza Monte Central)	-	+
Zea mays ssp. *mays* (Línea IFSC: WxEB)	+	+
Zea mays ssp. *mays* (Raza Amarillo Chico)	+	+

Para la construcción de las sondas ambas familias se eluyeron únicamente las bandas de maíz. En ambos casos se utilizó sólo el producto de 300 pb, ya que era la que presentaba mayor intensidad y por lo tanto cantidad de ADN. Dichos fragmentos fueron purificados y marcados tanto con biotina como con digoxigenina.

Al realizar los experimentos de FISH utilizando estas sondas, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

1) La secuencia "180-pb" hibridada sobre cromosomas de *Zea luxurians* mostró señales intensas de hibridación sobre todas las regiones DAPI + de posición telomérica, a excepción de un par de bandas pequeñas en posición subtelomérica (Fig. 27 A y B). Estas últimas estarían conformadas por otro tipo de secuencia repetida en tandem.

2) La secuencia "180-pb" hibridada sobre cromosomas de *Zea mays* ssp. *parviglumis* mostró señales intensas sobre la mayoría de las regiones DAPI + (Figuras 27 C-H), pero no sobre todas.

3) La sonda "180-pb" marcada con biotina y la TR-1 marcada con digoxigenina, fueron hibridadas simultáneamente sobre células de *Zea diploperennis*, mostrando señales intensas de hibridación sobre todas las regiones DAPI + (Figuras 28 H e I).

4) La secuencia "180-pb" hibridada sobre cromosomas de *Zea mays* ssp. *mexicana* mostró señales de hibridación muy débiles sobre las zonas DAPI + (Figuras 18 E y F). Este resultado sugiere que componentes de estas zonas heterocromáticas (DAPI +) de *Zea mays* ssp. *mexicana* poseen muy baja homología con la sonda "180-pb", lo cual es congruente con lo observado en el

experimento de GISH (Figuras 18 A-D) y con el hecho de no obtener producto de PCR al amplificar la sonda en esta especie (Tabla 4).

5) Los experimentos de FISH hibridando simultáneamente la sonda "180-pb" marcada con biotina y la TR-1 marcada con digoxigenina, sobre células de maíz pertenecientes a la raza Amarillo Chico y a la línea IFSC-13043 arrojaron resultados distintos. En Amarillo Chico la sonda TR-1 hibridó sólo en tres de las regiones DAPI +, mientras que la "180-pb" hibridó en todas las regiones DAPI+. Sin embargo, en dos de las regiones DAPI + que hibridan con TR-1, la señal de "180-pb" es mas débil (Figuras 28 A-D). En la línea IFSC-13043 la secuencia TR-1 hibridó sobre 4 de sus regiones DAPI +, mientras que la "180-pb" hibridó sobre todas con la misma intensidad en todas estas regiones (Figuras 28 E-G).

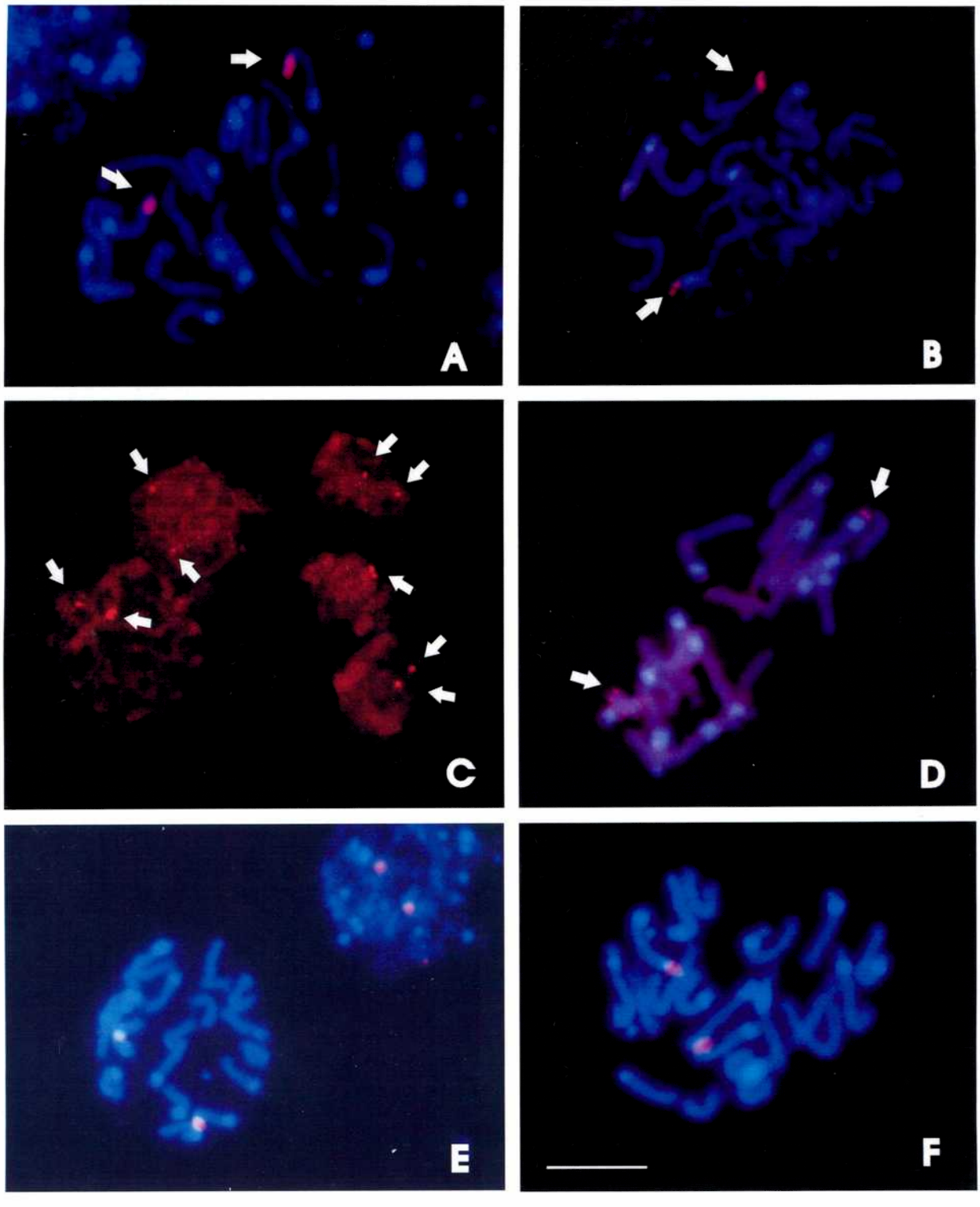


Figura 25: A-C, E y F: Distintas razas de *Zea mays* ssp. *mays*. **D:** *Zea mays* ssp. *parviglumis*. **A, B, D y F:** Metafase mitótica. **C y E:** Interfase-profase mitótica. Todas las células (**A-F**) fueron hibridadas con la secuencia ribosomal 5s de trigo (sonda pTa794) marcada con biotina y revelada con Cy3. Las flechas blancas señalan las zonas de hibridación. **A, B, D-F:** Contratinción DAPI. Barra= 10 *u*m.

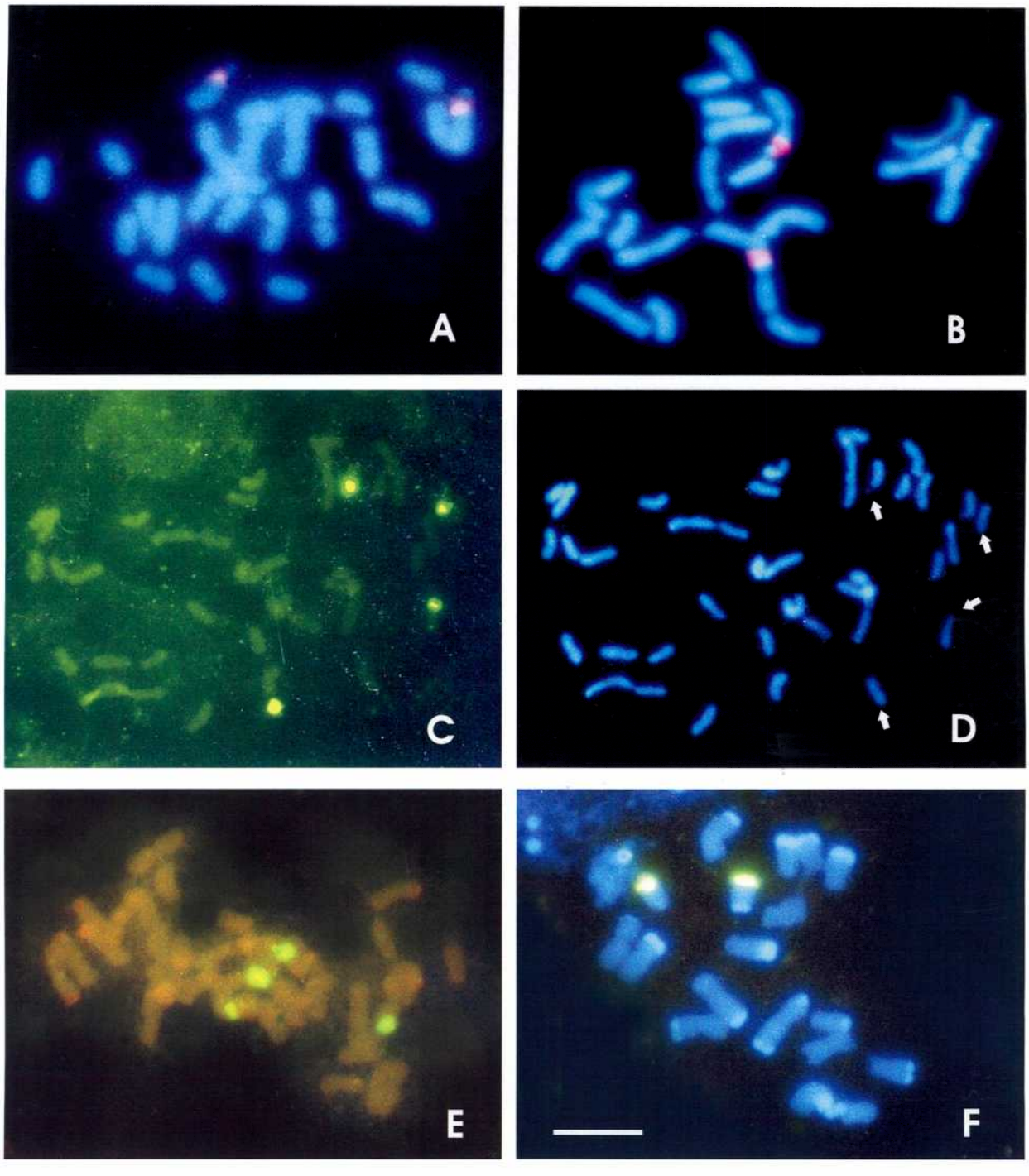


Figura 26: A y B: Metafases mitóticas de *Zea mays* ssp. *mays* hibridadas con la secuencia ribosomal 45s de trigo (sonda pTa71) marcada con biotina y revelada con Cy3. **C-E:** Metafases mitóticas de *Zea perennis;* **C y E:** FISH utilizando la sonda pTa71 marcada con digoxigenina y revelada con antidigoxigenina-FITC; **D:** Contratinción con DAPI. Las flechas indican la posición sobre los cromosomas de las señales de hibridación detectadas en la figura C. **F:** Metafase mitótica de *Zea luxurians* hibridada con la sonda pTa71 marcada con digoxigenina y revelada con antidigoxigenina-FITC. Barra= 10*u* m.

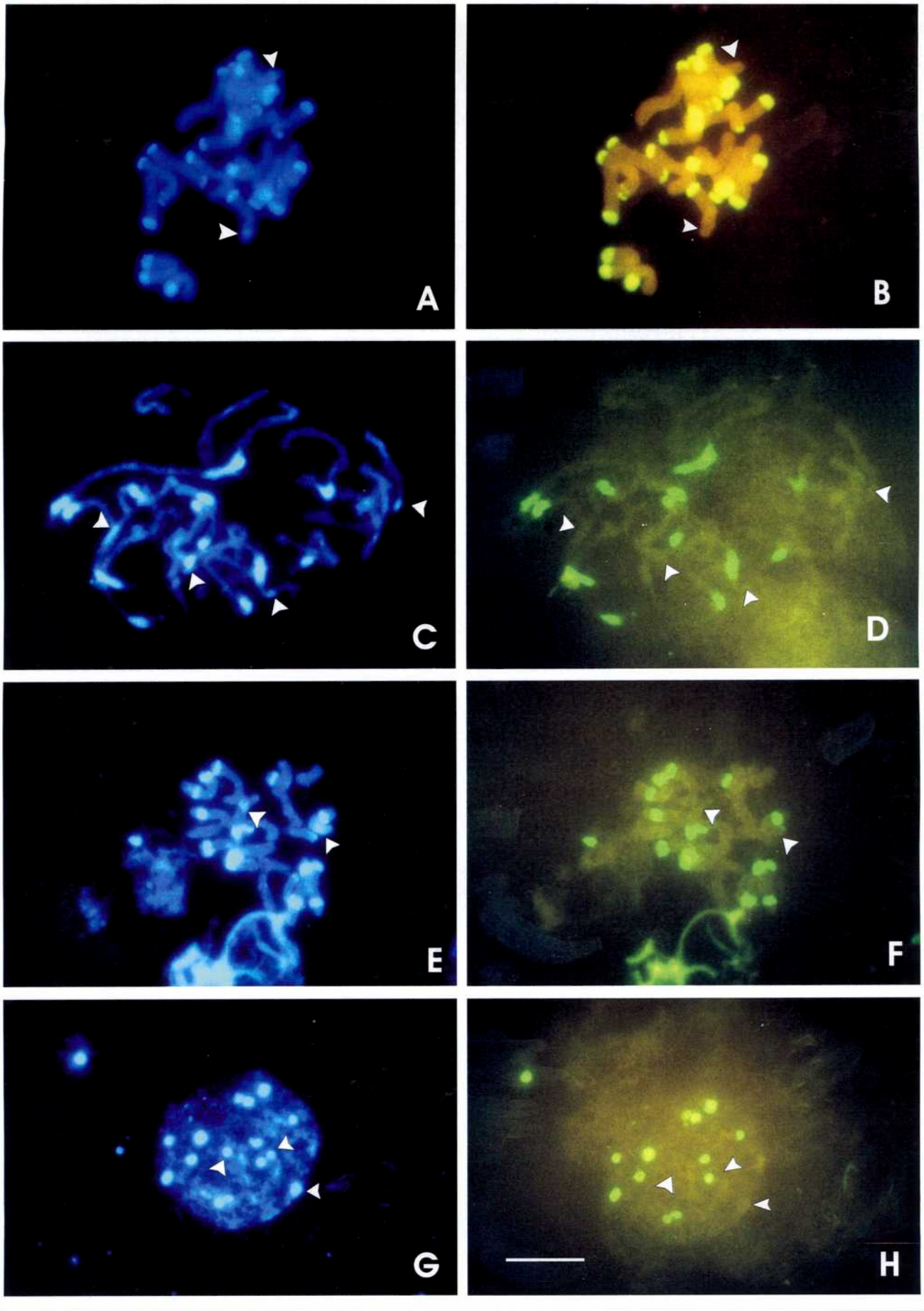


Figura 27: A y B: Metafase mitótica de *Zea luxurians*. **C-F:** Células de *Zea mays* ssp. *parviglumis*. **B, D, F y H:** Hibridación con la sonda "180-pb" del "knob" de maíz marcada con digoxigenina y detectada con antidigoxigenina-FITC. Las puntas de flecha indican bandas DAPI + que no hibridan con esta sonda. **A, C, E y G:** Contratinción con DAPI. Barra=10 *u*m.

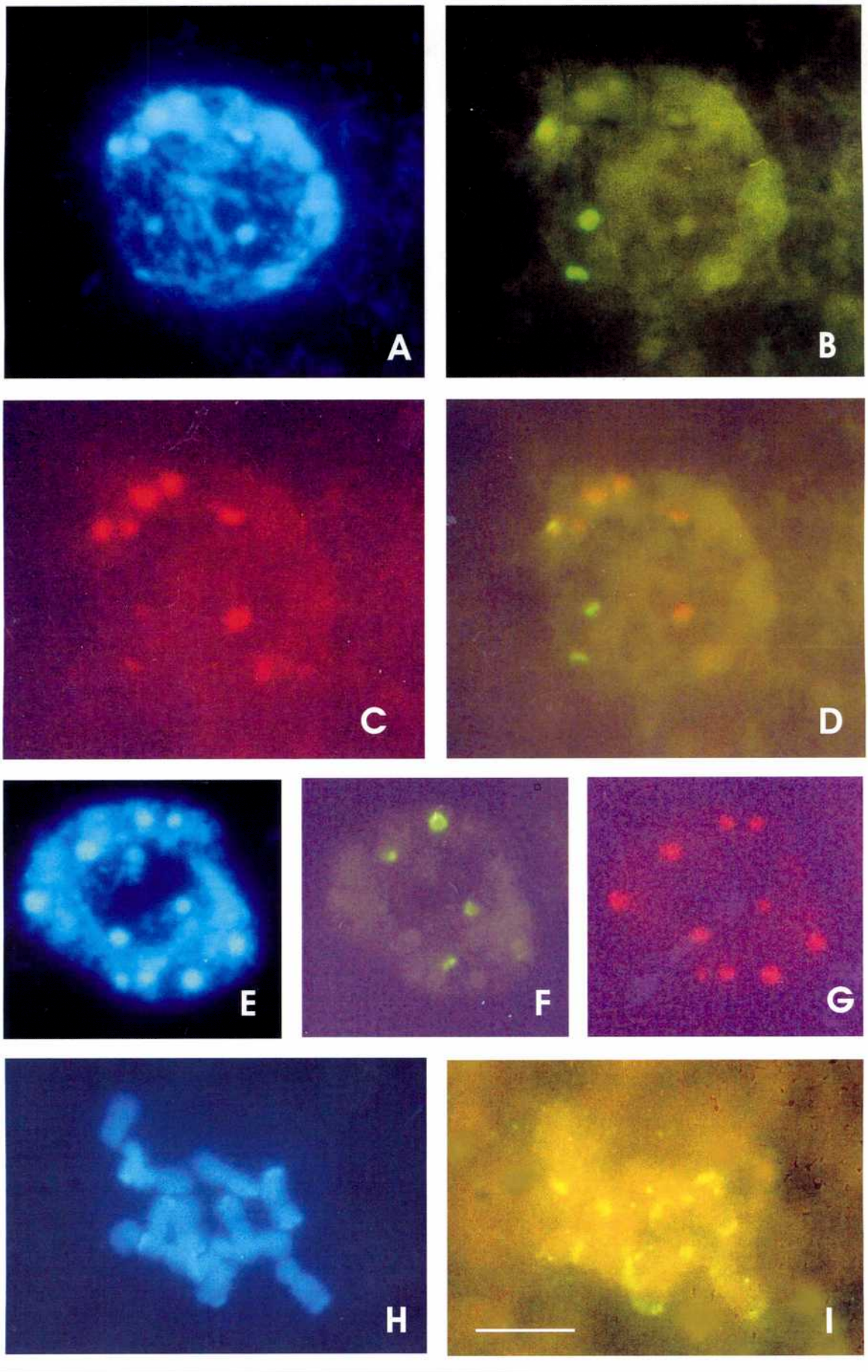


Figura 28: A-G: Núcleos interfásicos de *Zea mays* ssp. *mays*; **A y B:** raza Amarillo Chico; **E-G:** línea del IFSC Nº 13043. **A-G:** Hibridación simultánea con las secuencias del "knob" de maíz: TR-1 marcada con digoxigenina y revelada con antidigoxigenina-FITC, y 180 pb marcada con biotina y revelada con Cy3. **H e I:** FISH usando como sonda la secuencia TR-1 marcada con digoxigenina y revelada con antidigoxigenina-FITC. **A, E y H:** Contratinción con DAPI. Barra= 10 *u*m.

Discusión

DISCUSION

Los estudios de citogenética clásica brindaron valiosos aportes al conocimiento de los mecanismos de aislamiento reproductivo y modos de especiación en plantas. Uno de estos modos, el de especiación híbrida, ha sido estudiado con particular interés a través de técnicas citogenéticas. La especiación híbrida es muy común en plantas, en especial la que ocurre por medio de procesos de hibridación y posterior poliploidía, dando lugar a nuevas especies alopoliploides (Soltis y Soltis, 1999)

Como se mencionó previamente, numerosos estudios de citogenética clásica han demostrado que el género *Zea* sería alopoliplode críptico; es decir, que se habría originado por un proceso de hibridación y posterior poliploidía. Si bien existen fuertes evidencias que soportan esta afirmación, aún se desconocen las posibles especies progenitoras del género, y si estas son las mismas para todas las entidades. Cabe preguntarse entonces: ¿El evento de hibridación y poliploidía ocurrió una sola vez, antes de la diversificación del género *Zea* u ocurrió varias veces durante dicha diversificación promoviendo, por otro lado, una rápida generación de mecanismos de aislamiento reproductivo entre los distintos teosintes? ¿Habrá ocurrido un evento de hibridación también durante el proceso de domesticación del maíz?

Para contestar algunas de estas preguntas, muchos autores han realizado análisis filogenéticos tradicionales, utilizando, por ejemplo, marcadores isoenzimáticos, marcadores del ADN de cloroplastos e incluso microsatélites (Doebley *et al.,* 1984; 1987; Doebley, 1990; Matsuoka *et al.*, 2002). Los análisis filogenéticos tradicionales se basan en principios cladogenéticos, en donde las especies surgen a partir de un ancestro en común por procesos bifurcantes de diferenciación genética y generación de mecanismos de aislamiento reproductivo. Estos principios cladogenéticos son en cierto modo opuestos a los de especiación

híbrida, en donde los genomas de dos entidades ya diferenciadas y con aislamiento reproductivo precigótico se vuelven a "unir" dando lugar a una nueva especie (Gonzalez *et al.*, 2004). Por lo tanto, estos principios no deberían aplicarse en grupos donde se desconoce si la transferencia horizontal de genes por hibridación ocurrió mas de una vez durante su evolución y diversificación.

El análisis de afinidades genómicas mediante GISH, es independiente de los supuestos cladogenéticos y puede por lo tanto considerarse como una de las herramientas mas apropiadas en la actualidad para establecer el origen evolutivo de los distintos genomas en un alopoliploide, siempre y cuando dichos genomas no hayan sufrido tantas reestructuraciones que oscurezcan las antiguas divergencias heredadas de sus progenitores. Su aplicación en especies del género *Zea* ha sido de gran utilidad para empezar a responder algunas de las preguntas arriba mencionadas, y para dar sustento a las evidencias que nacieron de la citogenética clásica. Así lo demuestran los resultados obtenidos en este trabajo de tesis que se discuten en las siguientes secciones.

1. Comportamiento meiótico en híbridos de *Zea* con 2n=20: evidencias de aislamiento reproductivo postcigótico y de la naturaleza alotetraploide del género

Los híbridos entre taxones de la Sección Zea (*Zea mays* ssp. *parviglumis* x *Zea mays* ssp. *mexicana*, *Zea mays* ssp. *mays* x *Zea mays* ssp. *parviglumis* y *Zea mays* ssp. *mays* x *Zea mays* ssp. *mexicana*) presentaron meiosis regular con formación de 10 II y alta fertilidad polínica (Molina y Naranjo, 1987; Naranjo *et al.*, 1990). Estos híbridos mostraron morfología intermedia con respecto a sus progenitores en cuanto a las mazorcas y las semillas, las cuales presentan bajo porcentaje de germinación. Por otro lado, los híbridos estudiados en esta tesis que involucran a *Zea luxurians* (2n= 20) como progenitor femenino y a tres de las subespecies de *Zea mays* como progenitor masculino (*Zea mays* ssp.

parviglumis, *Zea mays* ssp. *mexicana* y *Zea mays* ssp. *mays*), presentaron la configuración meiótica más frecuente de 8 II + 4 I ó 9II + 2 I (Tabla 2). Además, mostraron varias anormalidades meióticas tales como: a) heterocigocis en las regiones "knob" (en paquitene y diacinesis) (Figuras 7 A y B; 8 A y B); b) II heteromórficos y I de diferente tamaño (en diplotene-diacinesis y metafase I) (Figuras 7 A-E; 8 E); c) entre 1 y 3 puentes con fragmentos (en anafase I) (Figuras 7 F y G; 8 F-H; 9 D), con lo cual se pudo deducir que *Zea luxurians* difiere en 2 a 3 inversiones paracéntricas de las subespecies de *Zea mays* que se usaron como progenitoras y d) cromosomas rezagados (en anafase I y II) (Figura 5 D).

Estas anormalidades meióticas explican la elevada esterilidad polínica de estos híbridos y pueden ser determinantes de aislamiento reproductivo postcigótico entre las especies parentales (Gonzalez *et al.*, 2002).

El híbrido interseccional *Zea luxurians* x *Zea diploperennis* (2n=20) es también altamente estéril con 8 II + 4 I como configuración más frecuente (en metafase I), siendo la mayoría de los II marcadamente heteromórficos (Figuras 5 A-C) (Tabla 2). Al igual que en los híbridos discutidos anteriormente los I de diferente tamaño permanecen rezagados o dividen sus cromátidas en anafase I (Poggio *et al.*, 1999 b).

La presencia de II heteromórficos o I de diferente tamaño observada en todos los híbridos que poseen a *Zea luxurians* como progenitor está correlacionada con diferencias en el tamaño del genoma, las cuales varían entre 2C=8.8 pg en *Zea luxurians* y 2C= 5.8 – 6.8 pg en el resto de las especies de *Zea* con 2n=20 (Tito *et al.*, 1991).

Por otra parte, en las especies e híbridos con 2n=20, se observó asincronía meiótica de dos grupos de 5 II cada uno durante diplotene-diacinesis (Figura 8 C) lo que sugiere la existencia de dos genomas ancestrales en las especies con 20 cromosomas. Estas observaciones aportan una importante evidencia de

poliploidía críptica en el género *Zea,* ya que indican que los dos genomas ancestrales (x=5) que constituyen a las especies e híbridos de 2n=20, conservan cierta individualidad estructural y funcional.

En la meiosis II del híbrido entre *Zea luxurians* (como progenitor femenino) y *Zea mays* ssp. *mays* (raza Amarillo Chico), se observó la activación de neocentrómeros, los cuales están localizados en las regiones "knobs" de *Zea mays* ssp. *mays* y de *Zea luxurians* (Figuras 7 H-N).

Como se mencionó anteriormente los "knobs" son bloques de heterocromatina cuyo tamaño, número y distribución varía entre diferentes líneas, razas de maíz y de teosintes. Están compuestos por repeticiones en "tandem" de una familia de secuencias denominada "180-pb" (Dennis y Peacock, 1984) y otra familia mas compleja, denominada TR-1 (Ananiev *et al.*, 1998; Hsu *et al.,* 2003). Las unidades de repetición de la familia "180-pb" posee una región de 68 pb homóloga a secuencias que mapean en los centrómeros de *Zea mays* ssp. *mays* (Ananiev *et al.*, 1998; Buckler *et al.*, 1999). Además, Page y colaboradores (2001) encontraron que esta familia es homóloga con una secuencia centromérica del cromosoma 4 de *Zea mays* ssp. *mays*. Estas homologías podrían explicar la actividad neocentromérica que se observa en las regiones "knobs" del híbrido *Zea luxurians* x *Zea mays* ssp. *mays*.

Existe un tipo anormal de cromosoma 10 (Ab10) que difiere del normal (N10) porque posee un segmento extra de cromatina en el extremo del brazo largo denominado K10 (Rhoades, 1978). Este K10 está unido a un "factor genético" que, cuando Ab10 está presente, K10 y los "knobs" de otros cromosomas forman neocentrómeros que migran hacia los polos por delante de los verdaderos centrómeros (Rhoades, 1978; Dawe y Cande, 1996; Yu *et al.,* 1997), de modo que en los heterocigotas Ab10/N10 el cromosoma Ab10 migra preferencialmente (conducción meiótica). Además, el grado y velocidad de segregación preferencial estarían correlacionados positivamente con el tamaño de

los "knobs" debido a que, a diferencia de los cinetocoros, los neocentrómeros se asocian lateralmente a los microtúbulos del huso por medio de proteínas "motoras" que interactuarían directa o indirectamente con las secuencias del "knob" y por lo tanto, no sería necesaria la despolimerización de los microtúbulos del huso (Yu *et al.*, 1997). La velocidad del movimiento neocentromérico de los "knobs" estaría correlacionada con el número de repeticiones de secuencias que posean, es decir, con el tamaño de los knobs (Yu *et al.*, 1997; Buckler *et al.*, 1999).

La actividad neocentromérica detectada en el híbrido *Zea luxurians* x *Zea mays* ssp. *mays* coincide con estas afirmaciones, ya que se observó que los "knobs" más grandes, pertenecientes a *Zea luxurians* son los que se encuentran más cercanos a los polos (Figuras 7 J, M y N), sugiriendo que estos cromosomas presentan mayor velocidad de movimiento sobre las fibras del huso. Dado que el maíz utilizado como progenitor masculino no posee un cromosoma Ab10, se puede postular que los neocentrómeros podrían haberse activado como consecuencia del estrés genómico producido por la combinación de diferentes genomas, por interacción núcleo-citoplasma, o debido a la presencia de "factores génicos" como los asociados al K10.

Es importante notar que la activación neocentromérica de los "knobs" pertenecientes a cromosomas de *Zea luxurians* no había sido descripta anteriormente. Este hallazgo puede ser importante en estudios futuros en los que se analicen diferencias en la actividad neocentromérica entre especies que poseen variaciones en el tamaño y constitución de sus regiones "knobs".

Se ha observado además, que la actividad neocentromérica descripta en el híbrido *Zea luxurians* x *Zea mays* ssp. *mays* causa estiramientos y ruptura de brazos cromosómicos durante la anafase II. Este hecho es congruente con la alta esterilidad de este híbrido y sugiere que la actividad neocentromérica estaría favoreciendo el aislamiento reproductivo postcigotico entre estas dos especies.

Todos los resultados discutidos hasta el momento aportan nuevas evidencias de poliploidía críptica en el género *Zea* e indican que *Zea luxurians* presenta el mayor grado de aislamiento reproductivo postcigótico en relación a las especies con 2n=20 cromosomas.

2. Comportamiento meiótico en híbridos de *Zea* con 2n=30: nuevas evidencias sobre poliploidía críptica

El estudio meiótico de poliploides e híbridos entre taxones con distinto nivel de ploidía aporta mayor información que el realizado en híbridos diploides o del mismo nivel de ploidía puesto que se puede analizar la afinidad relativa de distintos genomas en el mismo fondo genético. El análisis del comportamiento meiótico de híbridos inter e intraseccionales de *Zea* con 2n=30 cromosomas tales como *Zea perennis* x *Zea diploperennis* y *Zea perennis* x *Zea mays* ssp. *mays,* sugirió evidencias mas sólidas de que x=5 es el número básico del género y permitió establecer las formulas genómicas hipotéticas mostradas en la Tabla 1 (Naranjo *et al.,* 1990; 1994; Poggio y Naranjo 1995).

Estos híbridos con 2n=30 cromosomas presentaron como configuración más frecuente en metafase I: 5III+5II+5I. El híbrido *Zea luxurians* x *Zea perennis* (2n=30) obtenido artificialmente y estudiado en la presente tesis, también mostró esta última configuración meiótica en la mayoría de las células estudiadas (Tabla 2 y Figura 6A). Estos datos, analizados conjuntamente con los obtenidos para otros híbridos por otros autores, indican que todos los híbridos en los que *Zea perennis* es un progenitor poseen un comportamiento meiótico similar sugiriendo que las relaciones de los genomas Ap A'p y Ax, y Bp1, Bp2 y Bx serían semejantes.

Si bien el estudio del comportamiento meiótico de híbridos mediante técnicas de tinción clásicas pueden aportar datos muy valiosos para evaluar el grado de apareamiento y la homología que existe entre cromosomas de las

especies parentales, éstos no permiten discernir el origen genómico de cada cromosoma en las distintas configuraciones meióticas. En el caso particular de los híbridos con 2n=30 se pueden establecer dos hipótesis alternativas con respecto al origen de las distintas configuraciones: **1**) los bivalentes se forman por apareamiento alosindético (apareamiento de cromosomas que provienen de diferentes gametas parentales) del genoma B (Bp1) de *Zea perennis* con el genoma B (Bx) de las especies con 2n=20 cromosomas; los univalentes derivan de *Zea perennis* (Bp2), y los trivalentes están formados por dos cromosomas del genoma A (ApA´p) de *Zea perennis* y un cromosoma del genoma A (Ax) de la especie con 2n=20 cromosomas (Tabla 1); **2)** los bivalentes resultan del apareamiento autosindético (apareamiento de cromosomas provenientes de la misma gameta parental) de los genomas Bp1 y Bp2 de *Zea perennis*, mientras que los univalentes provienen del genoma Bx de las especies con 2n=20. Esta segunda hipótesis propone que los trivalentes están formados de la misma manera que la postulada en la hipótesis 1.

Estudios de bandeo C realizados por Tito y colaboradores (1991) habían mostrado que todos los cromosomas de *Zea luxurians* poseen bandas teloméricas C positivas y DAPI + en uno o ambos brazos (Figuras 11 A, C y E). Cuando las células mitóticas de *Zea luxurians* fueron hibridadas con ADN genómico de *Zea perennis* la mayoría de los cromosomas mostraron señal de hibridación con excepción de las zonas teloméricas DAPI + (Figuras 10, A y B). Por otro lado, Dennis y Peacock (1984) habían informado que la secuencia de la familia "180-pb" sería un componente de los "knobs" heterocromaticos en *Zea mays* ssp. *mays*, *Zea mays* ssp. *mexicana*, *Zea luxurians*, *Zea diploperennis* y *Tripsacum*, pero que no se encontraría en *Zea perennis*. Estos resultados explicarían la ausencia de hibridación en las zonas heterocromáticas de *Zea luxurians* cuando sus cromosomas se hibridan con *Zea perennis* como sonda. Sin embargo, los mismos no prueban que las zonas DAPI + no hibridadas de

Zea luxurians estén compuestas exclusivamente por la secuencia de la familia "180-pb". Al hibridar los cromosomas de *Zea luxurians* con la secuencia de "180-pb", se observó señal positiva en todas las zonas DAPI +, con excepción de dos bandas pequeñas (Figuras 27 A y B). Este último resultado confirma que la mayoría de las zonas DAPI + de *Zea luxurians* están constituidas, en gran parte, por dicha familia de secuencias repetidas en *tandem*. Por otro lado, la ausencia de esta familia en *Zea perennis* fue confirmada en otros experimentos de hibridación: **a)** cuando se utilizó como sonda ADN de *Zea perennis* sobre el resto de las especies del género, ya que no se observaron señales de hibridación en las zonas DAPI+ de las especies contrastadas (Figuras 20A y B) y **b)** cuando se hibridaron cromosomas de *Zea luxurians* con ADN genómico marcado de *Zea luxurians* y utilizando como bloqueante ADN genómico total de *Zea perennis* no marcado, ya que se observaron fuertes señales de hibridación solamente en las zona teloméricas DAPI + (Figura 11).

Los datos que aportaron los experimentos recién descriptos nos permitieron poner a prueba las dos hipótesis planteadas sobre el origen genómico de las distintas configuraciones, ya que se contaba con un marcador cromosómico. De hecho, se pudieron distinguir los cromosomas de *Zea luxurians* en células meióticas del híbrido *Zea luxurians x Zea perennis* (Figuras 10 C-J) hibridando con *Zea luxurians* marcado y *Zea perennis* no marcado (bloqueante). Así, se demostró que los bivalentes no poseían señal de hibridación mientras que los univalentes poseían una fuerte señal fluorescente en la región telomérica. Por otro lado se observó que el cromosoma de mayor tamaño del trivalente de tipo "fry-pan" presentaba una fuerte señal de hibridación, la que se correspondería con la de los cromosomas de *Zea luxurians* (Figuras 10 E-J). Mas aún, dependiendo del cromosoma del complemento de *Zea luxurians* involucrado en el trivalente, la señal de hibridación se observaba en uno o en ambos telómeros. Todos estos resultados

confirmaron la segunda hipótesis planteada anteriormente, por lo que se puede establecer que en el híbrido *Zea luxurians x Zea perennis* los bivalentes están formados por apareamiento autosindético entre genomas homeólogos de *Zea perennis* mientras que los univalentes provienen del genoma de *Zea luxurians.* Además los trivalentes están formados por apareamiento autosindético de los genomas Ap y A´p de *Zea perennis* y alosindético del genoma A_L de *Zea luxurians* (Tabla 1). En los trivalentes con forma de sartén (fry-pan) los cromosomas que conforman el anillo están apareados autosindéticamente (Figuras 10 E - J).

En los estudios meióticos clásicos del híbrido *Zea luxurians x Zea perennis* (2n=30) se observó que los bivalentes tienden a estar agrupados (Figura 6). Además, los experimentos de GISH realizados en este híbrido, señalan que estos II pertenecen al genoma de *Zea perennis* pues, además de ser homomórficos, no presentan señal de hibridación (Figuras 10 C y D).

Al hibridar con la secuencia 45s de ADN ribosómico de trigo (pTa71) se observaron cuatro señales de hibridación en *Zea perennis*, dos en *Zea luxurians* (Figuras 26 C-F) y tres en la mayoría de las células analizadas del híbrido, las cuales están ubicadas en un trivalente asociado al nucleolo. Estos resultados indican que los genes ribosomales se encuentran localizados en los genomas parentales que presentan mayor homología (genomas A, según las fórmulas propuestas en la Tabla 1).

El híbrido *Zea mays* ssp. *mays* x *Zea perennis* (2n=30) presenta las mismas configuraciones meióticas que las descriptas en *Zea luxurians x Zea perennis.* Al hibridar cromosomas meióticos del híbrido con ADN genómico de maíz y ADN de *Zea perennis* como bloqueante se observo señal de hibridación en los univalentes mientras que los II no presentaban señal de hibridación (Figuras 24 B y C). En 1924, Longley demostró que en un híbrido *Zea perennis* x *Zea mays* ssp. *mays,* solo el 4% del polen producía el fenotipo "waxy"

(marcador genético del genoma de maíz). Estos resultados indicaron que los univalentes que se perdían durante la meiosis se correspondían con el genoma de maíz. Estos datos son coherentes con los obtenidos aquí mediante GISH en donde se confirma que en los híbridos 2n= 30 los univalentes provienen de la especie progenitora que aporta el menor número cromosómico a los gametos.

Es interesante destacar que, al hibridar los cromosomas de *Zea perennis x Zea mays* ssp. *mays* con ADN ribosomal 45s (pTa 71) se observaron tres señales de hibridación ubicadas en la mayoría de los casos en un trivalente el cual esta formado por dos cromosomas de *Zea perennis* y uno de *Zea mays* ssp. *mays* (Figuras 24 A, E-G). Esto indicó que, al igual que en el híbrido *Zea luxurians x Zea perennis*, esta secuencia se encuentra localizada en los genomas que presentan el mayor grado de apareamiento en este híbrido (genoma A) (Tabla 1).

Se puede concluir del análisis conjunto de los resultados obtenidos de los estudios citogenéticos clásicos y moleculares, que se confirman las fórmulas genómicas postuladas en trabajos previos (Naranjo *et al.*, 1990; Poggio *et al.*, 2000a) (Tabla 1). En particular se confirma la hipótesis que sostiene que *Zea perennis* es un aloctoploide, con 4 genomas con distinto grado de divergencia entre ellos. Es interesante destacar que la formación de II y I en los híbridos con 2n= 30 cromosomas no es al azar y que el genoma A de las especies 2n= 20 es mas homologo a los genomas A de *Zea perennis* que a los genomas B propios. Estos datos dan nuevo sustento a la hipótesis sobre el origen híbrido del género.

3. Los experimentos GISH-FISH revelaron importantes divergencias genómicas en las especies y subespecies del género *Zea*

Como fue mencionado anteriormente, los "knobs" heterocromaticos de maíz se corresponden con regiones DAPI +. El número, tamaño y distribución de estas bandas (equivalentes a los "knobs" en paquitene), difiere entre líneas y

razas de maíz (Tito *et al.*, 1991; Poggio *et al.,* 1998). Experimentos de GISH utilizando como sonda ADN genómico de *Zea luxurians* sobre cromosomas de maíz, mostraron fuerte señal de hibridación en las regiones "knobs" e hibridación pareja, aunque débil, en el resto de los cromosomas (Figuras 12 F y G). La misma célula rehibridada con ADN genómico de *Zea diploperennis* mostró señal de hibridación fuerte tanto en los "knobs" como en el resto de los cromosomas. Estos datos indicarían que la afinidad entre *Zea diploperennis* y maíz es mayor que entre *Zea luxurians* y maíz. Estos resultados son congruentes con los estudios meióticos realizados (Tabla 2), dado que la meiosis en *Zea mays* ssp. *mays x Zea diploperennis* es regular con formación de 10 II en el 70% de las células estudiadas (Naranjo *et al.,* 1990), mientras que en *Zea luxurians* x *Zea mays* ssp. *mays* posee buen apareamiento, pero ocurren una serie de irregularidades meióticas posteriores que conllevan a la esterilidad total del híbrido (Tabla 2, Figura 7).

La afinidad genómica entre *Zea mays* ssp. *mays* y *Zea perennis* utilizando GISH ya había sido analizada por Takahashi y colaboradores (1999). Estos autores observaron señal de hibridación uniforme sobre todos los cromosomas de maíz al utilizar ADN de *Zea perennis* como sonda, y sugirieron que la falta de hibridación sobre zonas que dan fuerte señal al hibridar con ADN de otras especies se debería a que hubo gran divergencia en estas regiones cromosómicas de *Zea perennis*. El presente trabajo demostró que la falta de hibridación de *Zea perennis* sobre todas las zonas DAPI + se debe a la ausencia de las secuencias "180-pb" y TR-1 en la especie octoploide. Este resultado es consistente con el hecho que *Zea perennis* posee el menor contenido de ADN por genoma básico del género (Tito *et al.,* 1991).

En el presente trabajo se demostró que existen otras zonas divergentes, no descriptas anteriormente, entre *Zea mays* ssp. *mays* y *Zea perennis* ya que al aumentar las condiciones de astringencia y aplicar bloqueos genómicos, se

lograron discriminar zonas cromosómicas de maíz con distinto grado de homología con *Zea perennis* (Figuras 20 y 22). En síntesis se demostró que existe una importante divergencia entre los genomas de estos taxones debido a: **a)** la falta de hibridación sobre cuatro cromosomas de maíz al ser hibridados con la sonda de *Zea perennis*; **b)** la hibridación dispersa del ADN genómico de maíz sobre los cromosomas de *Zea perennis* y **c)** la ausencia de la secuencia "180-pb" en *Zea perennis* (Figura 20). Es interesante destacar que la divergencia observada entre *Zea perennis* y maíz también ocurre con respecto a *Zea luxurians*, dado que en experimentos de GISH, utilizando sonda de *Zea perennis* sobre cromosomas de *Zea luxurians* también se observaron cuatro cromosomas con señal muy débil de hibridación (Figuras 10A y B).

Hasta 1990 la clasificación de la especie *Zea mays* (Doebley e Iltis, 1980; Iltis y Doebley, 1980) reunía bajo la subespecie *Zea mays* ssp. *parviglumis* a las variedades *parviglumis* y *huehuetenanguensis,* las cuales fueron elevadas a subespecies luego del análisis isoenzimático y morfológico (Doebley, 1990). En este trabajo se estudiaron las afinidades genómicas entre las distintas subespecies de *Zea mays* y se realizaron experimentos de GISH hibridando cromosomas de maíz con el ADN genómico total marcado de *Zea mays* ssp. *parviglumis*, *Zea mays* ssp. *mexicana* y *Zea mays* ssp. *huehuetenanguensis*.

Takahashi y colaboradores (1999), hibridaron ADN genómico de *Zea mays* ssp. *parviglumis* sobre cromosomas de *Zea mays* ssp. *mays* y observaron una señal de hibridación intensa y homogénea sobre todos ellos. Sin embargo, en nuestros experimentos de GISH y FISH, al aumentar la astringencia y utilizar bloqueos genómicos se hallaron importantes diferencias entre *Zea mays* ssp. *mays* y *Zea mays* ssp. *parviglumis* (Gonzalez *et al.*, 2004).

La hibridación de cromosomas de *Zea mays* ssp. *mays* con ADN de *Zea mays* ssp. *mexicana* y *Zea mays* ssp. *huehuetenanguensis* (Figuras 17 y 19), conjuntamente con los datos hallados al hibridar con *Zea mays* ssp. *parviglumis*

(Figura 13), permiten concluir que *Zea mays* ssp. *mays* posee mucha mayor homología con *Zea mays* ssp. *mexicana* y *Zea mays* ssp. *parviglumis* que con *Zea mays* ssp. *huehuetenanguensis.* Estos resultados apoyan la separación de las últimas dos subespecies propuesta por Doebley (1990).

Finalmente, cabe destacar que del análisis comparativo de todas las afinidades genómicas reveladas en este estudio, *Zea perennis* sería la única especie del género que al hibridar sobre otros taxones no da señal sobre cromosomas enteros. Este resultado podría considerarse sugestivo en relación al origen híbrido del grupo, ya que estaría indicando que *Zea perennis* presenta un genoma mas divergente, que podría corresponderse a un progenitor diploide ancestral distinto.

Del análisis conjunto de la citogenética clásica y molecular se podría postular entonces que el genoma denominado A (Tabla 1) sería el mas afín para todas las especies analizadas, es decir sería un genoma común compartido (*"pivoltal genome"* de acuerdo a Stebbins, 1971). En cambio el genoma B tendría distintos grados de divergencias entre los distintos taxones de *Zea*, las cuales serían en algunos casos tan importantes como para poder ser consideradas como resultantes del origen híbrido involucrando un progenitor distinto.

Un descubrimiento importante de estos últimos años es que la mayoría de las especies taxonómicamente reconocidas como poliploides serían de "origen múltiple", es decir que se habrían formado recurrentemente a partir de diferentes poblaciones de sus progenitores. Poblaciones de orígenes independientes podrían entrar en contacto e hibridarse, generando nuevos genotipos, lo que explicaría la amplia variabilidad intraespecífica (Soltis y Soltis, 1999). Este proceso de poliploidización recurrente, que se demuestra para poblaciones o razas (Soltis y Soltis, 1999), podría extenderse para explicar el origen de todo un género, en cuyo caso es factible pensar que la hibridación y poliploidización no ocurra siempre entre las mismas especies ancestrales.

Si el genoma "B" de *Zea perennis* es tan divergente con respecto al "B" de *Zea luxurians* y *Zea mays* ssp. *mays*, ¿porque entonces se observan, 4 cromosomas y no 10 cromosomas (2 x X=5) con menor señal de hibridación? Una explicación a este fenómeno es el de la reestructuración genómica de estos poliplides crípticos, que fuera ampliamente demostrada para *Zea mays* ssp. *mays* (Gaut y Doebley, 1997, White y Doebley, 1998), y que oscurecería las antiguas divergencias de genomas enteros.

Por último, cabe destacar que estas divergencias observadas pueden ser explicadas simplemente por divergencias en retroelementos, los cuales forman parte importante del genoma de *Zea mays* ssp. *mays* (SanMiguel *et al.,* 1996). A este respecto nos referiremos en la siguiente sección sobre el origen del maíz domesticado.

Los experimentos de GISH demostraron que las bandas DAPI + de las distintas especies no siempre hibridan con las sondas genómicas de las otras especies, sugiriendo que existe variabilidad en la naturaleza de estas bandas heterocromáticas. Estudios de FISH utilizando sondas pertenecientes a la secuencia knob "180-pb" mostraron que *Zea mays* ssp. *parviglumis* y *Zea luxurians* no poseen esta secuencia en algunas regiones DAPI +. Esta misma secuencia, hibridada sobre cromosomas de *Zea mays* ssp. *mexicana* mostró señales de hibridación muy débiles sobre las zonas DAPI + (Figuras 18 E y F). Este resultado sugiere que la mayoría de los knobs de *Zea mays* ssp. *mexicana* poseen muy baja homología con la sonda "180-pb" .

Experimentos preliminares hibridando simultáneamente con ambas secuencias ("180-pb" marcada con biotina y TR-1 marcada con digoxigenina) mostraron señales intensas de hibridación sobre todas las regiones DAPI + de *Zea diploperennis* (Figuras 28 H e I). Estas mismas sondas, hibridadas simultáneamente sobre células de maíz pertenecientes a la raza Amarillo Chico y a la línea IFSC-13043 mostraron variabilidad en la frecuencia y localización de estas secuencias (Figura 28). Estos resultados sugieren que el análisis de la

composición de las secuencias knobs será de gran utilidad para caracterizar las razas de maíz. Por otro lado existen trabajos previos (Rosato *et al.*, 1998; Poggio *et al.*, 1998) que mostraron, en 13 razas nativas de maíz, una asociación negativa entre número y frecuencia de "knobs", frecuencia de cromosomas accesorios (cromosomas B), y altitud de crecimiento. Los resultados de la presente tesis abren un interesante interrogante acerca de si la composición de los knobs estarían relacionadas con las asociaciones descriptas entre "knobs", Bs y factores ecogeográficos.

4. Acerca del origen del maíz domesticado: ¿Es *Zea mays* ssp. *parviglumis* el único progenitor del maíz moderno?

El estudio del origen y la evolución del maíz y de sus especies silvestres relacionadas ha llevado a la formulación de diferentes hipótesis (Mangelsdorf, 1986; Cámara-Hernández, 1989; Cámara-Hernández y Gambino, 1990; Naranjo *et al.*, 1990; Gaut y Doebley, 1997; Walker *et al.*, 1998; Eubaunks, 2001; Matsouka *et al.*, 2002). Entre todas ellas, la más aceptada actualmente sostiene que el teosinte anual *Zea mays* ssp. *parviglumis* sería el antecesor directo del maíz moderno, debido a que éste es el que presenta mayor afinidad genética en marcadores isoenzimáticos y moleculares (Galinat, 1988; Doebley *et al.*, 1990). Por este motivo, distintos autores han postulado que *Zea mays* ssp. *parviglumis* es el teosinte que habría originado al maíz actual como resultado de un único evento de domesticación sucedido entre 7.000 y 10.000 años desde la actualidad (Gaut y Doebley, 1997; Walker *et al.*, 1998; Matsouka *et al.*, 2002).

Takahashi y colaboradores (1999), hibridaron ADN genómico total de *Zea mays* ssp. *parviglumis* sobre cromosomas de *Zea mays* ssp. *mays* y observaron una señal de hibridación intensa y homogénea sobre todos ellos. Sin embargo, en nuestros experimentos de GISH y FISH, al aumentar la astringencia y utilizar bloqueos genómicos se han podido hallar importantes

divergencias entre *Zea mays* ssp. *mays* y *Zea mays* ssp. *parviglumis* (Gonzalez *et al.*, 2004).

La pregunta que surge de estos resultados es entonces acerca de cómo pudo esta diferenciación observada en el maíz y su probable progenitor, surgir en tan sólo 7.000-10.000 años, el tiempo transcurrido desde su domesticación (Walker *et al.*, 1998). Una posibilidad es que las secuencias reveladas como propias de maíz por GISH, es decir no compartidas con *Zea mays* ssp. *parviglumis* podrían: a) haber sido introducidas y amplificadas durante este período, ó b) ya estaban presentes en *Zea mays* ssp. *parviglumis*, en bajo número de copias, y se amplificaron luego de su "transformación" en el maíz actual. Las secuencias que podrían explicar ambas hipótesis serían los retroelementos, los cuales ocupan una gran proporción del genoma de *Zea mays* ssp. *mays* (SanMiguel *et al.*, 1996; Meyers *et al.*, 2001). La introducción de nuevos retroelementos en el genoma de maíz podría ser explicada por procesos de transmisión horizontal, el cual fue demostrado para varios tipos de elementos móviles (Cummings, 1994). La amplificación posterior de estos elementos podría ser consecuencia del estrés ambiental –determinado por el proceso de domesticación- el cual puede dar lugar a un aumento en la frecuencia de transposición de elementos móviles (Kidwell y Lisch, 1997).

Otra hipótesis acerca del origen del maíz domesticado, sostiene que éste estaría compuesto por los genomas de teosinte y de *Tripsacum* (Eubanks, 2001). Esta hipótesis intergenérica está basada en el hecho de que la progenie recombinante, obtenida a través de cruzamientos experimentales entre *Tripsacum* y *Zea diploperennis*, mostraba mazorcas con características de maíces primitivos (Mangelsdorf *et al.*, 1964, 1967; Benz, 2001; Eubanks, 2001). En un trabajo previo, Poggio y colaboradores (1999 a) demostraron que cuando el ADN genómico marcado de *Tripsacum dactyloides* se hibrida sobre los cromosomas de maíz, todo el complemento muestra una señal de hibridación de moderada a alta, indicando una importante afinidad genómica entre ambas

especies. Además, una región localizada sobre el cromosoma 6 de maíz, próxima al organizador nucleolar, presentó señal de hibridación intensa, indicando alta homología con *Tripsacum* (Poggio *et al.*, 1999 a), pero carece de homología con *Zea mays* ssp. *parviglumis* (Figura 13). Si bien el nivel de hibridación general observado entre ambas especies puede ser explicada por relación de ancestralidad y/o retroelementos compartidos (Meyers *et al.*, 2001), podría ser consecuencia también del proceso de introgresión de *Tripsacum* en el genoma de maíz durante su domesticación.

Por último, cabe destacar que siendo la poliploidización recurrente un fenómeno tan común en plantas poliploides (Soltis y Soltis, 1999), no es improbable que este proceso haya ocurrido también durante el origen del maíz domesticado, lo que explicaría además la amplia variabilidad cromosómica y morfológica que se observa entre las razas de maíz. Por lo tanto, de los resultados presentados en este trabajo de tesis se puede proponer que si bien *Zea mays* ssp. *parviglumis* es la subespecie mas afín al maíz, no existen evidencias que indiquen que este sea su único antecesor directo.

Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

Ali Mohammed H.B., Fransz P. and Schubert I. 2000. Localization of 5S RNA genes on tobacco chromosomes. *Chromosome Res.* 8:85-87.

Anamthawat-Jonsson V., Schwarzacher T., Leitch A.R., Bennett M.D. and Heslop-Harrison J.S.. 1990. Discrimination between closely related Triticeae species using genomic DNA as a probe. *Theor. Appl. Genet.* 79:721-728.

Ananiev E.V., Phillips R.L. and Rines H.W. 1998. A knob associated tandem repeat in maize capable of forming fold-back DNA segments: are chromosome knobs megatransposons? *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 95(18): 10785-10790.

Anderson E.G. 1945. What is *Zea mays*? A report in progress. *Chrom. Bot.* 9:88-92.

Beadle G.W. 1939. Teosinte and the origin of maize. *J. Hered.* 30:245-247.

Beadle G.W. 1972. The mystery of maize. Field Museum of Natural History Bulletin 43:2-11.

Bejarano E.R., Khashoggi A., Witty M. and Lichtenstein C. 1996. Integration of multiple repeats of geminiviral DNA into the nuclear genome of tobacco during evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:759-764.

Benavente E., Fernandez-Calvin B. and Orellana J. 1996. Relationships between the levels of wheat-rye metaphase I chromosomal pairing and recombination revealed by GISH. *Chromosoma.* 105:92-96.

Benavente E., Orellana J. and Fernandez-Calvin B. 1998. Comparative analysis of the meiotic effects of wheat *ph1b* and *ph2b* mutations in wheat x rye hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 96:1200-1204.

Bennett M.D.1983. The spatial distribution of chromosomes. Brandham PE, Bennett MD (eds). Kew Chromosome Conference II. Allen & Unwin, London, pp71-79.

Bennett M.D. 1984. The genome, the natural karyotype and biosystematics. Plant biosystematics (Grant, WF, ed.). Academic Press, New York, pp41-66.

Bennett, M.D. 1995. The development and use of genomic *in situ* hibridization (GISH) as a new tool in plant biosystematics. Kew Chromosome Conference

IV (Brandham, P.E. and Bennett, M.D. eds.) Royal Botanic Gardens, Kew, pp 167-183.

Bennett S.T. and Bennett M.D. 1992. Spatial distribution of ancestral genomes in the wils grass *Milium montianum*. *Parl. Ann. Bot.* 70:111-118.

Bennett M.D. and Leitch I.J. 1995. Nuclear DNA amounts un angiosperms. *Annals of Botany* 76:113-176.

Bennett M.D. and Smith J.B. 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 334:309-345.

Benz B.F. 2001. Archaeological evidence of teosinte domestication from Guilá Naquitz, Oxaca. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 98:2104-2106.

Buckler E.S., and Holtsford T.P. 1996. *Zea* systematics: ribosomal ITS evidence. *Mol. Biol. Evol.* 13:612-622.

Buckler E.S., Phelps-Durr T.L., Buckler, C.S., Dawe R.K., Doebley J.F. and Holtsford T.P. 1999. Meiotic drive of chromosomal knobs reshaped the maize genome. *Genetics* 153:415-426.

Cámara Hernández, J. 1989. Restos arqueológicos de maíz (*Zea mays* L.) de León Huasi, Provincia de Jujuy, Argentina. Com. Cient., Dir. Prov. Antropol. e Hist. (Jujuy, Argentina) 1(1):18-26.

Cámara Hernández, J. and Gambino S. 1990. Ontogeny and morphology of *Zea diploperennis* inflorescences and the origin of maize (*Zea mays* ssp. *mays*). *Maydica* 35:113-124.

Cao M., Sleper D.A., Dong F. and Jiang J. 2000. Genomic *in situ* hybridization (GISH) reveals high chromosome pairing affinity between *Lolium perenne* and *Festuca mairei*. *Genome* 43: 398-403.

Cuadrado A. and Jouvé N. 1995. Fluorescent *in situ* hybridization and C-banding analyses of hyghly repetitive DNA sequence in the heterochromatin of rye (*Secale montanun* Guss.) and wheat incorporating *S. montanun* chromosomes segments. *Genome* 38 (4):795-802.

Cummings M.P. 1994. Transmission patterns of eukaryotic transposable elements: arguments for and against horizontal transfer. *TREE* 9:141-145.

Darlington C.D. 1956. Chromosome Botany. Allen and Unwin, London.

Dawe R.K. and Cande W.Z. 1996. Induction of centromeric activity in maize by suppressor of meiotic drive I. *Genetics* 93:8512-8517.

Dennis E. and Peackock W. 1984. Knob heterochromatin homology in maize and its relatives. *J. Mol. Evol.* 20:341-350.

Doebley J.F. 1990. Molecular systematics of *Zea* (Gramineae). *Maydica* 35:143-150.

Doebley J.F. 1992. Mapping the genes that made maize. *Theor. Appl. Genet.* 8:302-307.

Doebley J.F., Goodman M.M. and Stuber C.W. 1984. Isoenzymatic variation in *Zea* (Gramineae). *Syst. Bot.* 9:203-218.

Doebley J.F., Goodman M. and Stuwer, C. 1987. Patterns of isozime variation between maize and Mexican anual teosinte. *Econ. Bot.* 41:234-246.

Doebley J.F. and Iltis H.H. 1980. Taxonomy of *Zea*. 1. Subgeneric classification with key to taxa. *Am. J. Bot.* 67:982-993.

Doebley J.F., Renfroe W. and Blanton A. 1987. Restriction site variation in the *Zea* chloroplast genome. *Genetics* 117:139-147.

Doebley J.F., Stec A., Wendel J. and Edwards M. 1990. Genetic and morphological analysis of maize- teosinte F2 population: implications for the origin of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* USA 87:9888-9892..

Eubanks M. 1997. Molecular analysis of crosses between *Tripsacum dactyloides* and *Zea diploperennis* (Poaceae). *Theor. Appl. Genet.* 94:707-712.

Eubanks M. 2001. The mysterious origin of maize. *Econ. Bot.* 55:492-514.

Fedak G., Chen Q., Conner R.L., Laroche A., Petroski R. and Armstrong K.W. 2000. Characterization of wheat-*Thinopyrum* partial amphiploids by meiotic analysis and genomic *in situ* hybridization. *Genome* 43:712-719.

Galinat, W.C. 1988. The Origin of Corn. pp. 1-31. In Sprague, G., Dudley, J., Eds. Corn and Corn Improvement, Third Edition. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin. 986 pp.

Garriga-Calderé F., Huigen D.J., Filotico F., Jacobsen E. and Ramanna M.S. 1997. Identification of allien chromosomes through GISH and RFLP anllysis and the monosomic addittions of tomato chromosomes. *Genome* 40:666-673.

Gaut B.S and Doebley J.F. 1997. DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA. 94:6809-6814.

Gerlach W.L. and Bedbroock J.R. 1979. Cloning and chracterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nuclei Acids Res.* 7:1869-1885.

Gonzalez G., Comas C., Naranjo C. and Poggio L. 2002 a. Meiotic analysis of the artificial hybrids between *Zea luxurians* and the subespecies of *Zea mays*. *Mays Genet. Coop.*, USA.76:42.

Gonzalez G., Confalonieri V., Comas C., Naranjo C. A. and Poggio L. 2004. GISH reveals cryptic genetic differences between maize and its putative wild progenitor *Zea mays* ssp. *parviglumis*. *Genome* (en prensa).

Goodman M.M. 1988. The history and evolution of maize. *CRC Crit. Rev. Plant. Sci.*7:197-220).

Grant V. 1985. The Evolutionary Process. W.H. Freeeman and Co. San Francisco, pp 499.

Helentjaris, T., Weber, D. and Wright, E. 1988. Identification of the genomic locations of duplicate nucleotide sequences in maize of Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Genetics* 118:353-363.

Heslop–Harrison J.S., Schwarzacher T., Leitch A.R., Anamthawat-Jónsson K. and Bennett M.D. 1988. A method of identifying DNA sequences in chromosomes of plants. European patent amplification number 8828130.8, December 2, 1988.

Hinnisdaels S., Mouras A.S., Veuskens J., Taylor C., Gharti-Chhetri T., Negrutiu I. and Jacobs M. 1992. Tanslocation events demonstrated by molecular *in situ* hybridization and chromosome pairing analysis in highly asymmetic somatic hybrid plants. *Transgenic Res.* 1:170-176.

Hsu F.C., Wang C.J., Chen M.C., Hu H.Y. and Chen C.C. 2003. Molecular characterization of a family of tandemly repeated DNA sequences, TR-1, in heterochromatic knobs of maize and its relatives. *Genetics* 164: 1087-1097.

Iltis H.H. 1983. From teosinte to maize: the catastrophic sexual transmutation. *Science*. 222:886-893.

Iltis, H.H. and Doebley, J.F. 1980. Taxonomy of *Zea* (Gramineae). 2. Sub-specific categories in the *Zea mays* complex and a generic synopsis. *Am. J. Bot.* 67: 994-1004.

Iltis H.H., Doebley J.F., Guzmán R. and Pazy B. 1979. *Zea diploperennis* (Gramineae): a new teosinte from México. *Science*. 203:186-188.

Jackson R.C. and Murray B.G. 1983. Colchicine-induced quadrivalent formation in Helianthus: evidence of ancient polyploidy. *Theor. Appl. Genet.* 64:219-222.

Jacobsen E., de Jong J.H., Kamstra S.A., van den Berg P.M. and Ramanna M.S. 1995. Genomic *in situ* hybridization (GISH) and RFLP analysis for the identification of alien chromosomes in the backcross progeny of potato (+) tomato fusion hybrids. *Heredity*. 74:250-257.

Kato, Y.T. 1976. Cytological studies of maize (*Zea mays* L.) and teosinte (*Zea mexicana* Schrader Kuntze) in relation to their origin and evolution. *Mass. Agric. Exp. Stn. Bull.* 635: 1-185.

Kato, Y.T. and Lopez R. 1990. Chromosome knobs of the perennial teosintes. *Maydica* 35:125-141.

Kenton A., Parakonny A.S., Gleba Y.Y. and Bennett M.D. 1993. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. Genome by melecular cytogenetics. *Mol. Gen. Genet.* 240:159-169.

Kidwell M.G. and Lisch D. 1997. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 94:7704-7711.

Laurie, D.A. y Bennett, M.D. 1985. Nuclear DNA content in the genera *Zea* and *Sorghum*. Intergeneric, interespecific and intraspecific variation. *Herediy* 55:307-313.

Leggett J.M. and Markhand G.S. 1995. The genomic structure of *Avena* revealed by GISH. In: Brandham P. E., Bennett M. D. (eds), Proceedings of Kew chromosome conference IV, pp 133-139. The Royal Botanical Gardens, Kew.

Leitch A.R., Mosgöller W., Schwarzacher T., Bennett M.D. and Heslop-Harrison J. S. 1990. Genomic *in situ* hybridization to sectioned nuclei shows chromosome domains in grass hybrids. *J. Cell. Sci.* 95:335-341.

Levan, A., Fredga, K. and Sandberg, A. 1964. Nomenclature for centromeric position of chromosomes. *Hereditas*. 52: 201-220.

Longley A.E. 1924. Chromosome of maize and maize relative. *J. Agric. Res* .28:673-681.

Longley A.E. 1945. Abnormal segregation during megasporogenesis in maize. *Genetics* 30:100-113.

Mangelsdorf P.C. 1947. The origin and evolution of maize. *Advances in Genetics* 1:161-207.

Mangelsdorf P.C. 1974. Corn: Its origin, evolution and improvement. Harvard University Press, Massachusetts.

Mangelsdorf P.C. 1986. The origin of corn. *Scient. Amer.* 254:80-86.

Mangelsdorf P.C., Mac Neish R.S. and Galinat W.C. 1964. Domestication of corn. *Science* 143:538-545.

Mangelsdorf P.C., Mac Neish R.S. and Galinat W.C. 1967 a. Prehistoric wild and cultivated maize. Pages 178-200 in D. S. Byes, ed., The prehistory of the Tehuacán Valley. Volume 1: Enviroment and subsistence. University of Texas Press, Austin.

Mangelsdorf P.C and Reeves R.G. 1938. The origin of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 24:303-312.

Maniatis T., Fritdch E.F. and Sabrook J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Matsuoka Y., Vigouroux Y., Goodman M., Sanchez J., Buckler E and Doebley J.F. 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite gentyping. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* USA. 99:6080-6084.

McClintock B. 1933. The association of non-homologous parts of chromosomes in the midprofhase of meiosis in *Zea mays. Z. Zellforsch Mikrosk Anat* 19:191-237.

McClintock B., Kato Y. and Bluemenshein A. 1981. Chromosome constitution of race of maize. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.

Meyers B.C., Tingey S.V. and Morgante M. 2001. Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome. *Genome Research*. 11:1660-1676.

Molina, M.C. and. Naranjo C.A. 1987. Cytogenetic studies in the genus *Zea*. 1. Evidence for five as the basic chromosome number. *Theor. Appl. Genetics.* 73:542-550.

Moore G., Devos K.M., Wang Z. and Gale M.D. 1995. Cereal genome evolution. Grasses, line up and form a circle. *Current Biology*. 5(7):737-739.

Naranjo, C., M. Molina y L. Poggio. 1990. Evidencias de un número básico x=5 en el género *Zea* y su importancia en estudios del origen del maíz. *Acad. Nac. Cs. Ex. Fís. y Nat.*, Buenos Aires, Monografía 5:43-53.

Naranjo, C., Poggio, L and Brandham. 1986. A new template for direct morphological classification of chromosomes. *Darwiniana* 27: 39-41.

Naranjo, C., Poggio L., Molina M. and Bernatené E. 1994. Increase in multivalent frequency in F1 hybrids of *Zea diploperennis* x *Zea perennis* by colchicine treatment. *Hereditas*. 120:241-244.

Page B.T, Wanous M.K. and Birchler J.A. 2001. Characterization of a maize chromosome 4 centromeric sequence: evidence for an evolutionary relationships with the B chromosome centromere. *Genetics* 159: 291-302.

Peacock, W.J., Dennis, E.S., Rhoades, M.M. and Pryor, A.J. 1981. Highly repeated DNA sequences limited to knob heterochromatin in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 78:4490-4494.

Poggio, L., Confalonieri, V., Comas, C., Cuadrado, A., Jouve, N. y Naranjo, C. 1999 a. Genomic *in situ* hybridization (GISH) of *Tripsacum dactyloides* and *Zea mays* ssp. *mays* with B- chromosomes. *Genome* 42:687-691.

Poggio, L., Confalonieri, V., Comas, C., Gonzalez, G., Naranjo, C. 1999 b. Genomic affinities among *Zea luxurians, Zea perennis* and *Zea diploperennis*: meiotic behaviour in the F1 and genomic *in situ* hybridization (GISH). *Genome* 42:993-1000.

Poggio, L., Confalonieri, V., Comas, C., Gonzalez, G. y Naranjo C.A. 2000 a. Evolutionary relationships in the genus *Zea*: analysis of repetitive sequences used as cytological FISH marker. *Genetics and Molecular Biology* 23:1021-1027.

Poggio, L., Confalonieri, V., Comas, C., Gonzalez, G. y Naranjo C.A. 2000 b. Aportes de la citogenética molecular al análisis de divergencias genómicas

crípticas en el género *Zea* (Poaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 35:297-304.

Poggio, L., Molina, M. and Naranjo, C.A. 1990. Cytogenetic studies in the genus *Zea*. 2. Colchicine induced multivalents. *Theor. Appl. Genet.* 79:461-464.

Poggio, L. and Naranjo C.A. 1995. Origen del maíz: evidencias citogenéticas. Reuní. Latinoam. Zona Andina. Inv. Maíz. Pp: 969-980.

Poggio L., Rosato M., Chiavarino M., Naranjo C.A. 1998 b. Genome size and environmental correlations in maize. *Annals of Botany* 82:115-117.

Price, H.J. 1988. DNA content variation withing angiosperm species. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 75:1248-1257.

Raina S.N. and Rani V. 2001. GISH technology in pant genome research. *Meth. Cell Sci.* 23:83-104.

Randolph L.F. 1976. Contribution of wild relatives of maize to the evolutionary history of domesticated maize: a synthesis of divergent hypotheses I. *Econ. Bot.* 30:321-345.

Rhoades, M. 1942. Preferential segregation in maize. *Genetics* 27:395-407.

Rhoades, M. 1978. Genetic effects of heterochromatin in maize. *Maize Breeding and Genetics*, edited by B. D. Walden. Wiley and Sons, New York. pp. 641-672.

Rosato M., Chiavarino A., Naranjo C., Cámara Hernandez J. and Poggio, L. 1998. Genome size and numerical polymorphism for B- chromosome races of maize (*Zea mays ssp. mays* Poaceae). *American Journal of Botany* 85: 168-174.

SanMiguel P. and Bennetzen J. L. 1998. Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposones. *Annals of Botany* 82 (A):37-44.

SanMiguel P., Tikhonov A., Jin Y.K., Motchoulskaia N., Zakhariv D., Melake-Berham A., Springer P.S., Eswards K.L., Lee M., Avramova Z., Bennetzen J.L. 1996. Nested retrotransposons in the intergenetic regions of the maize genome. *Science* 274:765-768.

Schubert I., Shi F., Fuchs J. and Endo T.R. 1998. An efficient screening for terminal deletions and trnaslocations of barley chromosomes added to common wheat. *Plant J.* 14:489-495.

Schwarzacher T., Leitch A.R., Bennett M.D., Heslop-Harrison J.S. 1989. *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann. Bot.* 64:315-324.

Sharma A.K. and Sharma A. 2001. Chromosome painting – principles, strategies and scope. *Meth. Cell Sci.* 23: 1-5.

Soltis D.E. and Soltis P.S. 1999. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *TREE* 14(9):48-352.

Stebbins G.L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Addison-Wesley Publishing Company, London. 216 pp.

Sybenga J. 1975. Meiotic Configurations. Springer Verlag, 251 pp.

Takahashi, C., Marshall, J.A., Bennett, M.D. y Leitch, I.J. 1999. Genomic relationships in maize and its wild relatives. *Genome* 42:1201-1207.

Ting Y.C. 1985. Meiosis and fertility of anther culture-derived maize plant. *Maydica* 30:161-169.

Tito C., Poggio L. y Naranjo C.A. 1991. Cytogenetics studies in the genus *Zea*: DNA content and heterochromatin in species and hydris. *Theor. Appl. Genet.* 83:58-64.

Vijendra Das L.D. 1970. Chromosome associations in diploid and autotetraploid *Zea mays* L. *Cytologia* 35:259-261.

Walker, A.; Gaut, R.; Hilton, H.; Feldman, D. and Gaut, B. 1998. Investigation of the botleneck leading to the domestication of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* USA. 95:4441-4446.

Wendel J., Stuber C., Edwards M. and Goodman M. 1986. Duplicated chromosome segments in maize (*Zea mays* L.) further evidence for hexokinase isoenzymes. *Theor. Appl. Genet.* 72:178-185.

White S. and Doebley J. 1998. Of genes and genomes and the origin of maize. *Trends Genet.* 14:327-332.

Wilkes, H.G. 1967. Teosinte: the closest relative of maize. The Bussey Inst. of Harvard Univ., Cambridge, M. A.

Wilkes H.G. and Goodman M.M. 1995. Mystery and missing links: the origin of maize. Taba S (ed.). Maize Genetics Resources, CIMMYT, Mexico DF pp1-6.

Yu Hong-Gu, Hiatt E., Chan A., Sweeney M. and Dawe R.K. 1997. Neocentromere-mediated chromosome movement in maize. *J. Cell. Biol.* 139:831-840.

Anexo

ANEXO

TÉCNICAS CITOGENÉTICAS

Buffer Acido Cítrico - Citrato de Sodio, pH 4,8:

A: Disolver 0.84 gr de Acido Cítrico monohidratado (Merck) en 40 ml de agua destilada estéril (0.1 M)

B: Disolver 1.76 gr de Citrato Trisódico bihidratado (Merck) en 60 ml de agua destilada estéril (0,1 M)

Solución stock (10X): 40 ml A + 60 ml B.

Solución de trabajo: diluir una parte de la solución stock en 9 partes de agua destilada.

Solución enzimática de Celulasa y Pectinasa:

A: Mezclar 1,6 g de Celulasa al 2% (p/v) (Calbiochem o Sigma), 16 ml de Pectinasa al 20% (v/v) (Sigma) y 64 ml de buffer Acido Cítrico - Citrato de Sodio, pH 4,8 (ver punto anterior).

B: Mezclar 0,4 g de Celulasa Ozonuka RS al 2% (p/v) (Merck), 4 ml de Pectinasa al 20% (v/v) (Sigma) y 16 ml de buffer Acido Cítrico - Citrato de Sodio, pH 4,8 (ver punto anterior).

Solución de trabajo: Unir 4 partes de la mezcla A con 1 parte de la mezcla B. Agitar en agitador magnético y guardar en tubos tipo "eppendorf" a -20°C.

Hematoxilina acética

- Hematoxilina (Merck)	1 gr.
- Acido Acético Glacial	45 cc
- Agua destilada estéril	55 cc

- Mezclar con agitación y estacionar durante 15 a 20 días antes de utilizar.

- Guardar en frasco color caramelo, en oscuridad y a temperatura ambiente.

Mordiente de Citrato Férrico

- Agregar cristales de Citrato Férrico a una solución de Acido Acético 45%.
- Calentar hasta disolver los cristales.
- Filtrar y guardar en frasco color caramelo, en oscuridad y a temperatura ambiente.

Buffer Mc Ilvaine pH 7

- Solución A (0.1 M): Disolver 2.101 gr de Acido Cítrico monohidratado (Merck) en 100 ml de agua destilada estéril.
- Solución B (0.2 M): Disolver 28.4 gr de Fosfato Acido Disódico (Merck) en 100 ml de agua bidestilada estéril.
- En el momento de usar mezclar: 8.8 ml de Solución A + 41.2 ml de Solución B.

Colorante DAPI (4´6´diamidino-2-phenylindole.2HCl)

Solución stock (0.2 mg/ml): Disolver 0.2 mg de DAPI (Sigma) en 1 ml de agua bidestilada estéril.

Solución colorante (0.001 mg/ml): Diluir 25 µl de la solución stock en 5 ml de Buffer Mc Ilvaine (Ver punto anterior).

Conservar ambas soluciones a 4°C o a -20°C.

HIBRIDACIÓN *IN SITU*

a) Obtención de ADN genómico total.

Buffer de Lisis

Tris-ClH 1OOmM pH 8.

ClNa 1OO mM

EDTA 50 mM pH 8.0

SDS 2%

Proteinasa K 100 µg / ml

Para preparar 50 ml de buffer de lisis, mezclar:

1) 5 ml de sol. stock de Tris-ClH 1M pH 8.5.
2) 5 ml de sol. stock de ClNa 1M.
3) 5 ml de sol. stock de EDTA 0.5M pH 8.0
4) 10 ml de sol. stock de SDS 10% pH 7.2
5) 250 µl de sol. stock de Proteinasa K 20 mg/ml.
6) 25 ml de H_20 destilada estéril.

Mezclar 1+2+3+6 y esterilizar. Luego agregar 4.

Utilizar a 50°C y agregar la Proteinasa K hasta una concentración de 100 ug/ml en el momento de usar.

Tris-ClH 1M.

- Disolver 121,1 gr de Trisma base (Sigma) en 800 ml de agua destilada. Si la solución 1M tiene color amarillo se debe descartar.
- Ajustar el pH al valor deseado agregando ClH concentrado según la tabla:

pH	ClH
7.4	70 ml
7.6	60 ml
8.0	42 ml

8.5 20-25 ml

Llevar el volumen a 1000 ml con agua destilada.

Separar en alícuotas y esterilizar en autoclave.

ClNa (1 M)

Disolver 58,44 gr de ClNa en 800 ml de agua destilada.

Ajustar el volumen hasta 1000 ml con agua destilada.

Separar en alícuotas, esterilizar en autoclave y guardar a temperatura ambiente.

EDTA (O,5 M, pH 8.0)

Disolver 186,1 gr de EDTA dihidratado (Sigma) en 800 ml de agua destilada.

Agitar vigorosamente con agitador magnético.

Ajustar el pH a 8.0 con grageas de NaOH. El EDTA no se disuelve completamente hasta que el pH no se ajustó a 8.0.

Completar con agua destilada estéril hasta un volumen 1000 ml.

Separar en alícuotas, esterilizar en autoclave y guardar a temperatura ambiente.

SDS 10%

Disolver 100 gr de SDS - Sodio Dodecil Sulfato (Sigma) en 900 ml de agua destilada esteril.

Calentar hasta 68ºC para disolver.

Ajustar el pH a 7.2 agregando de unas gotas de HCl concentrado.

Llevar hasta un volumen de 1000 ml con agua destilada estéril.

Separar en alícuotas y guardar a temperatura ambiente.

No autoclavar.

Solución de Proteinasa K (solución stock)

Disolver la Proteinasa K (Sigma) en agua destilada estéril hasta llegar a una concentración de 20 mg/ml.

Separar en alícuotas en tubos "eppendorf" estériles y conservar a –20°C.

Acetato de Sodio (3 M, pH 5,2)

Disolver 408,1 gr de Acetato de Sodio trihidratado en 800 ml de agua destilada.

Ajustar el pH a 5,2 con Acido Acético Glacial.

Llevar hasta un volúmen de 1000 ml con agua destilada.

Separar en alícuotas, esterilizar en autoclave y guardar a 4°C.

Estabilización de Fenol

1) Para preparar 100 ml de Fenol estabilizado, el fenol puro que debe estar guardado a -20°C, se deja llegar a temperatura ambiente y se lo coloca en baño térmico a 68°C para disolverlo y quede transparente.
2) A los 100 ml de Fenol se le agrega 8-hidroxiquinoleína-8Q (Merck) hasta una concentración final del 0,1% y se disuelve con agitador magnético. El 8Q es un antioxidante y un inhibidor parcial de la RNAsa. En este momento la solución toma un color amarillo - anaranjado.
3) Se agrega un volumen de Tris-ClH (0,5 M, pH 8,0) a temperatura ambiente y se agita con agitador magnético durante 15 minutos.
4) Se pasa a una ampolla de decantación de vidrio para que se separen las fases Tris-ClH (blanca, superior) y Fenol (amarilla, inferior) y se recoge la fase fenólica. Este paso se repite 2 veces más.
5) El pH en la fase Tris-ClH debe ser mayor a 7 ya que si es menor el ADN extraído tenderá a en la fase fenolica.
6) Se agrega 0,1 volumen de Tris-ClH pH 8.0 que contenga 0,2% de N-mercaptoetanol (Merck).

7) La solución de Fenol estabilizado debe guardarse bajo una capa de Tris-ClH 100 mM pH 8.0, en una botella color caramelo, a 4°C.

Buffer TE

Mezclar 10 mM Tris - ClH pH 8.0 con 1 mM EDTA pH 8.0.

Para preparar 200 ml mezclar: 2 ml sol. stock Tris - ClH 1M, pH 8.0 con 0,4 ml sol. stock EDTA 0,5M, pH 8.0 y 198.6 ml de agua destilada.

- Autoclavar y guardar a 4°C.

RNAasa (libre de DNAasa)

Disolver RNAasa A (Sigma) hasta una concentración de 10 mg/ml en Acetato de Sodio 0,01M, pH 5.2.

Calentar hasta los 100°C durante 15 minutos y llevar a temperatura ambiente.

Ajustar el pH a 7.4 agregando 0,1 volumenes de Tris-ClH (1M).

Separar en alicuotas y guardar a -20°C.

b) Amplificación de secuencias a través de cultivos bacterianos:

Medio de cultivo LB para bacterias:

Disolver 10 gr de Tripteína (Britania), 5 gr de Extracto de levadura (Britania) y 10 gr de Cl Na en 1 litro de agua destilada.

Se ajustar el pH a 7 con NaOH.

Autoclavar directamente en los tubos de siembra de las bacterias.

Placas para bacterias:

Disolver 15 gr de Agar-agar (Britania) en 1 litro de medio de cultivo LB (ver punto anterior) calentando en baño térmico y agitando.

Esterilizar en autoclave y dejar enfriar.

Al llegar a 37 °C aproximadamente agregar el antibiótico necesario y agitar (por ejemplo, Ampicilina a 100 µg/ml de agua destilada estéril, o Cloranfenicol a 75 ug/ml de Alcohol Etílico absoluto).

Bajo un campo de flujo laminar se agregar 15 ml de la solución a cada caja de Petri estéril y deja solidificar.

Aislamiento del ADN plasmídico (miniprep):

Solución I para miniprep:

Preparar una solución con de agua destilada de: Tris-HCl 25 mM pH 8 (3.0275 gr/lt), EDTA 10 mM pH 8 (3.722 gr/lt), Sacarosa al 20% y Lisozima (2 gr/lt).

Autoclavar y guardar a temperatura ambiente.

Solución II para miniprep:

Realizar una solución en agua destilada estéril con NaOH (0.2 N) y SDS (Sodio Dodecil Sulfato) al 1%.

No autoclavar y guardar a temperatura ambiente.

Glicerol tindalizado:

Colocar 1 ml de Glicerol (Merck) en un tubo tipo "eppendorf" estéril y hacerlo hervir a baño de María durante 15 minutos.

Repetir esta operación durante tres días consecutivos.

No autoclavar y guardar a –20°C.

c) Cuantificación del ADN en gel de Agarosa:

Buffer TAE (10 X)

Disolver en agua destilada: 48.4 gr de Tris-HCl (0.04M), 3.722 gr de EDTA disódico (0.001M) y 11.4 ml de Acido Acético Glacial.

Llevar hasta un volumen de 1000 ml con agua destilada y ajustar el pH a 8.3 con ClH.

Autoclavar y guardar a temperatura ambiente.

Buffer de siembra

Mezclar Azul bromofenol (0.25 %) con Sacarosa 40 % (p/v) diluida en agua.

Guardar a 4ºC.

d) Reacción de hibridación entre la sonda y el ADN blanco

Paraformaldehido (40%):

Agregar 4 g Paraformaldehido (Fluka) a 100 ml de agua destilada.

Calentar hasta 60°C y disolver con agitador magnético hasta que adquiera un aspecto lechoso y llegue a temperatura ambiente.

Añadir 2 ml de NaOH 1M y continuar agitando hasta que se vea transparente.

Formamida desionizada:

Colocar 500 ml de Formamida (Fluka o Merck) a 50 gr de resina (Resina analytical grade mixed bed resine AG 501-X8 (D) Bio Rad Lab. cat 142-6425).

Agita con agitador magnético durante 1 hora o hasta que la resina, que es originalmente de color verde, quede de color amarilla.

Filtrar con papel y guardar a -20ºC.

Sulfato de Dextrano

Preparar el Sulfato de Dextrano (Sigma o Pharmacia) al 50% en agua destilada.

Esterilizar por filtración con filtro milipore.

Guardar en tubos tipo "eppendorf" estériles a –20°C.

Buffer 20xSSC

Disolver 175.32 gr de Cloruro de Sodio (3M) y 88.23 gr de Citrato de Sodio monohidratado (300mM) en agua destilada hasta llegar a un litro de volumen.

Ajustar el pH hasta 7.

Autoclavar y guardar a temperatura ambiente.

Buffers para Dot-blot
Buffer 1

Disolver 5.005 gr de Acido maleico (100 mM) y 4.383 gr de Cloruro de Sodio (150 mM) en agua destilada hasta un volumen de 500 ml.

Llevar a pH 7 con NaOH.

Autoclavar y guardar a temperatura ambiente.

Buffer 2

Diluir 1 : 10 (BRSS - Blocking Reagent : buffer 1 de Dot-blot).

Prepararlo en el momento de usar.

BRSS (Boehringer Mannheim – Germany).

Buffer 3

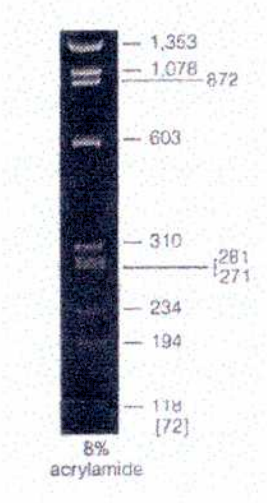
Diluir en agua destilada estéril: 6.055 gr de Tris base (100 mM), 2.922 gr de Cloruro de Sodio (100mM) y 2.377 gr de Cloruro de Magnesio (50 mM) y llevar hasta un volumen de 500 ml con agua destilada estéril.

Ajustar el pH a 9.5 con ClH.

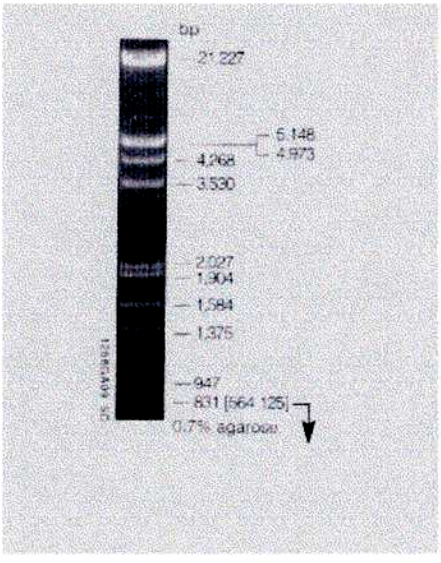
No autoclavar y guardar a temperatura ambiente.

Marcadores de Peso Molecular utilizados

λ Eco RI/Hind III Marker (Promega)



Φ X 174 DNA/Hae III Marker (Promega)



Buenos Aires, 7 de abril 2004

Señores Miembros de la Comisión
de Doctorado de la Facultad de
Ciencias Exactas y Naturales
S/D

De nuestra mayor consideración

En nuestro carácter de directores de Tesis, tenemos el agrado de elevar el informe del desempeño de la doctorando Licenciada Graciela Esther Gonzalez.

Durante el período de formación de postgrado el desempeño de la Lic. Graciela Gonzalez ha sido óptima, no sólo por la excelente labor experimental realizada sino por la relevancia de los resultados obtenidos.

En este período ha adquirido destreza en técnicas de citogenética molecular en plantas (FISH-GISH). Además ha realizado cursos y participado de seminarios que han acrecentado su nivel académico en general, y en citogenética clásica y molecular en particular.

La Licenciada G. Gonzalez ha cumplido los objetivos planteados en el plan de tesis. En el género *Zea* ha revelado la afinidad genómica que existe entre las especies parentales de híbridos inter e intraespecíficos obtenidos artificialmente, a través del análisis del apareamiento cromosómico, mediante citogenética clásica. Ha estudiado las afinidades genómicas entre los distintos taxones del género *Zea* mediante experimentos de hibridación *in situ* genómica (GISH) utilizando sondas de ADN genómico total. Ha logrado aumentar la especificidad de las sondas genómicas mediante la aplicación de bloqueos genómicos en experimentos de GISH con el objeto es observar los distintos grados de divergencia genómica que existe entre taxones muy relacionados. Ha realizado mapeos cromosómico en maíz y las especies silvestres relacionadas por medio de estudios de hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Estos estudios de identificación cromosómica en el género le permitieron analizar la distribución espacial de los distintos genomas en el núcleo y

detectar la composición genómica de híbridos interespecíficos. Ha encontrado marcadores cromosómicos que permiten discriminar los genomas de las especies parentales en la meiosis de híbridos interespecíficos. En resumen, ha resultados relevantes para el conocimiento del origen y evolución del maíz y especies relacionadas.

Además de los aportes originales de esta tesis de doctorado, consideramos muy importantes los hallazgos realizados que abren futuras hipótesis de trabajo y líneas de investigación.

Parte de sus trabajos de tesis han sido publicados en revistas internacionales con referato, y han sido citados en recientes revisiones. Sus avances en este tema han merecido recientemente el premio "Juan H. Hunziker 2003" al mejor trabajo de Citogenética Vegetal, otorgado por la Sociedad Argentina de Botánica y el Instituto de Botánica Darwinion.

Sin otro particular saludamos a Ud. muy atentamente

Dra. Lidia Poggio

Dra. Viviana A. Confalonieri