

RELEVANCIA DEL NÚMERO Y COMPOSICIÓN DE SECUENCIAS DE LOS NUDOS CROMOSÓMICOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE MAÍZ Y TEOCINTLE

RELEVANCE OF NUMBER AND SEQUENCE COMPOSITION OF KNOBS IN THE CHARACTERIZATION OF MAIZE AND TEOSINTE

Graciela Esther González*, María Florencia Fourastié y Lidia Poggio

Departamento de Ecología Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - Ciudad Universitaria - C1428EGA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Tel: 011-4576-3300 int. 218.

*Autor para correspondencia (gegonzalez@ege.fcen.uba.ar)

RESUMEN

Los *knobs* o nudos cromosómicos son bloques heterocromáticos que se pueden encontrar en 34 posiciones cromosómicas diferentes en maíz (*Zea mays ssp. mays*) y teocintle (*Zea mays ssp. parviflumis*, *Zea mays ssp. mexicana*, *Zea mays ssp. huehuetenanguensis*, *Zea luxurians*, *Zea nicaraguensis* y *Zea diploperennis*). Estos son variables en número, tamaño y posición entre accesiones de maíz y pueden detectarse, mediante bandeos cromosómicos C y DAPI (4', 6'-diaminofenilindol), tanto en metafases como en núcleos interfásicos. A nivel molecular están constituidos por dos familias de secuencias (180-bp y TR-1) representadas por miles a millones de copias, en distintas proporciones unas de otras, y constituyen diferentes tipos de *knobs*. En este trabajo se analizaron las variaciones en la cantidad de regiones *knob* y en la composición de sus secuencias en distintas accesiones de maíz y teocintle, para su caracterización citogenética. Para ello se emplearon técnicas de citogenética clásica (tinción con DAPI) y molecular (Hibridación *In Situ* Fluorescente-FISH). El fluorocromo DAPI reveló variación en el número de regiones DAPI+ (*knobs*) sobre los cromosomas y los núcleos interfásicos. El FISH mostró que las señales de hibridación se localizaron en las regiones DAPI+ y reveló la constitución de secuencias de cada *knob*, para así demostrar que no sólo existe variación en el número de *knobs* entre las accesiones analizadas sino también en el tipo de secuencias que los componen. Con los patrones de hibridación obtenidos fue posible diferenciar entre las accesiones de maíz y de teocintle estudiadas, aportar datos para su caracterización citogenética, y contribuir al conocimiento de la variabilidad genética del género *Zea*.

Palabras clave: *Zea*, *knobs*, maíz, teocintle, caracterización citogenética, FISH.

SUMMARY

Knobs are heterochromatic blocks that can be found in 34 different chromosomal locations in maize (*Zea mays ssp. mays*) and teosintes (*Zea mays ssp. parviflumis*, *Zea mays ssp. mexicana*, *Zea mays ssp. huehuetenanguensis*, *Zea luxurians*, *Zea nicaraguensis* and *Zea diploperennis*). These are variable in number, size and position among different accessions of maize and teosintes and can be detected by chromosome banding C and DAPI (4', 6'-diaminofenylindole), both in metaphases and in interphase nuclei. At a molecular level they are constituted by two families of sequences (180-bp and TR-1), and are represented by thousands to millions of copies, in different proportions to each other, forming the different types of *knobs*. In this study we analyzed if the variation in the number of *knobs* regions and the composition of their sequences allow the cytogenetic characterization of different maize and teosinte accessions. For this study, we applied classical (DAPI) and molecular (Fluorescence *In Situ* Hybridization-FISH) cytogenetic techniques. DAPI staining showed variations in the number of DAPI+ regions (*knobs*) on chromosomes and interphase nuclei. FISH showed co-localized hybridization signals with the DAPI+ regions; it also revealed variation of the sequences composition of *knobs* among the accessions tested. These results allowed finding

differential hybridization patterns to discern different accessions of maize and teosintes herein studied, therefore providing data for cytogenetic characterization and contributing to the knowledge of the genetic variability of the genus *Zea*.

Index words: *Zea*, *knobs*, maize, teosintes, cytogenetic characterization, FISH.

INTRODUCCIÓN

El género *Zea* L. (Poaceae/Tribu Maydeae) es una de las entidades biológicas más importantes, ya que el maíz (*Zea mays ssp. mays*) es cultivado en toda la Tierra y es en la actualidad una de las principales fuentes de alimentación humana y animal (Cámara y Arancibia, 2007). A las especies silvestres de *Zea* se les denomina colectivamente teocintle. Este grupo comprende tres subespecies de *Zea mays* L. (*Zea mays ssp. parviflumis* Iltis & Doebley, *Zea mays ssp. mexicana* Schrader, y *Zea mays ssp. huehuetenanguensis* Iltis & Doebley), y cuatro especies: *Zea luxurians* (Durieu & Ascherson) Bird, *Zea nicaraguensis* (Iltis & Benz), *Zea diploperennis* Iltis (Doebley & Guzmán) y *Zea perennis* (Reeves & Mangelsdorf). Todos los taxones mencionados poseen 2n = 20 cromosomas excepto *Zea perennis* que posee 2n = 40. En algunas razas de maíz se han observado cromosomas accesorios (cromosomas B) en frecuencias variables (Rosato *et al.*, 1998; Poggio *et al.*, 1998).

Los cromosomas de *Zea* presentan bloques de heterocromatina, denominados nudos cromosómicos o *knobs* (Kato, 1976; McClintock, 1978). Esta heterocromatina posee mayor condensación y está constituida por secuencias de ADN altamente repetidas (Peacock *et al.*, 1981). Los *knobs* pueden visualizarse tanto en células en división como también en núcleos interfásicos como cromocentros (Wan y Widholm, 1992). En núcleos interfásicos los bloques heterocromáticos se corresponden con los *knobs*, y existe una correlación positiva entre el número y tamaño de estos bloques y las bandas heterocromáticas de los cromosomas metafásicos (Kato, 1976). Este último autor observó, en paquietenos de maíz y teocintle, que los *knobs* pueden encontrarse en 34 posiciones cromosómicas diferentes, y se pueden detectar

mediante bandeos cromosómicos C y DAPI (Poggio *et al.*, 1998; González y Poggio, 2011).

Algunos estudios demostraron que los *knobs* son variables en tamaño, número y posición entre diferentes líneas y razas de maíz (Kato, 1976; McClintock *et al.*, 1981; Tito *et al.*, 1991; Rosato *et al.*, 1998). Estos caracteres cariotípicos han sido utilizados como marcadores en la caracterización de distintas líneas y razas de maíz mexicanas y centroamericanas (Kato, 1976; McClintock *et al.*, 1981). Lo anterior demuestra que el estudio de los nudos cromosómicos puede ser una herramienta útil para la clasificación racial y geográfica de las razas de maíz y una indicación de diversidad racial (McClintock *et al.*, 1981).

Existen diferencias intra e interespecíficas en el tamaño del genoma de maíz y de teocintle que fueron relacionadas con determinados factores ecogeográficos, atribuidas principalmente a las variaciones en el número y tamaño de los *knobs* (Laurie y Bennett, 1985; Rayburn *et al.*, 1985; Tito *et al.*, 1991; Poggio y Naranjo, 1990). Poggio *et al.* (1998) observaron que el número, tamaño y frecuencia de *knobs* poseen una correlación negativa con la altitud de cultivo de distintas razas de maíz nativas del noroeste de Argentina (NOA). Aún se desconocen las razones, causas o mecanismos evolutivos que expliquen estas correlaciones, y si las mismas pueden depender sólo del porcentaje de heterocromatina o si las secuencias que conforman los *knobs* podrían explicar dichas relaciones.

Kato *et al.* (2009) consideran que los *knobs* deben estar sujetos a la acción de la selección tanto natural como artificial y, por tanto, adquieren valores adaptativos variables y se convierten en elementos muy importantes en la evolución de las poblaciones de *Zea*.

A nivel molecular, los *knobs* están constituidos por una familia de secuencias de 180 pares de bases (180-pb) y otra de 350 pares de bases (TR-1), y pueden albergar varios retrotransposones (Peacock *et al.*, 1981; Dennis y Peacock, 1984; Ananiev *et al.*, 1998a y b). Ambas familias están representadas por miles a millones de copias dispuestas en *tándem*, en distintas proporciones unas de otras, y constituyen los tres tipos de *knobs*: los formados exclusivamente por repeticiones de 180-pb, los formados exclusivamente por repeticiones de TR-1, y los formados por ambas secuencias en distintas proporciones (Ananiev *et al.*, 1998a y b). Estos autores encontraron en la secuencia TR-1 dos regiones, una de 31 pb y otra de 12 pb, que son homólogas a la secuencia 180-pb, por lo que propusieron que TR-1 habría evolucionado a partir de la secuencia 180-pb por duplicación y posterior divergencia.

Si bien el número y posición de los *knobs* han sido utilizados por muchos autores para la caracterización de razas de maíz de Latinoamérica (Longley, 1938; Roberts *et al.*, 1957; Wellhausen *et al.*, 1957; Ramírez *et al.*, 1960; Grobman *et al.*, 1961; Kato, 1976; McClintock *et al.*, 1981), no se registran datos de caracterizaciones citogenéticas que tengan en cuenta la composición de secuencias de los *knobs*, tanto en maíz como en teocintle. La técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) permite la detección y localización de secuencias específicas sobre núcleos interfásicos y cromosomas. Con el uso de las secuencias 180-pb y TR-1 como sondas en experimentos de FISH es posible revelar la composición molecular de los *knobs* (Albert *et al.*, 2010; González y Poggio 2011).

Al aplicar técnicas de citogenética clásica (tinción DAPI) y molecular (FISH) en este trabajo se demuestra que, además del número y tamaño de los *knobs*, su composición de secuencias es de gran utilidad en la caracterización de distintas accesiones de maíz y teocintle.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales utilizados para este trabajo, con sus accesiones y procedencias, se listan en el Cuadro 1. Las razas de maíz empleadas son nativas del Noroeste de Argentina (NOA) y provienen de poblaciones originales cultivadas a diferentes altitudes en las Provincias de Tucumán, Salta y Jujuy. Las mismas fueron cedidas por Ing. Agr. Julián Cámarra Hernández del Laboratorio Vavilov de la Facultad de Agronomía (FA) de la Universidad de Buenos Aires (UBA), y por el banco de semillas de INTA-Pergamino (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). Los teocintles fueron cultivados y mantenidos en el campo experimental de la FA-UBA. Se analizaron entre cuatro y siete individuos de cada accesión y al menos 10 células por individuo.

Preparaciones cromosómicas

Para su germinación las semillas fueron colocadas en cajas de Petri con papel de filtro embebido en agua estéril. Las raíces fueron pretratadas en una solución de 8-hidroxiquinoleína (0.002 M) durante 3 h a 20 °C y fijadas en una solución de alcohol etílico absoluto-ácido acético (3:1). Los ápices radicales se lavaron en amortiguador (ácido cítrico-citrato de sodio 0.01 M, pH 4.6) antes y después de ser tratados con una solución enzimática con 2 % de celulasa (Onozuka R10, Merck®) y 20 % de pectinasa (SIGMA® P4716) durante 30 min a 37 °C. Finalmente, se realizó el aplastado del tejido sobre una gota de ácido acético (45 %) en un portaobjetos. Luego de remover el cubreobjetos por congelamiento, las preparaciones fueron secadas al aire para su utilización en los experimentos de FISH.

Cuadro 1. Accesiones de maíz y de teocintle con sus respectivas altitudes de cultivo, localidades de colección y orígenes.

Materiales de <i>Zea</i> (altitud de cultivo)	Accesión	Localidad	Legado por
Maíz Raza Capia Blanco (2800 m)	ARZM09291	Uquía, Depto. de Humahuaca, Jujuy, Argentina	INTA Pergamino
Maíz Raza Amarillo Chico (2000 m)	VAV 6451	El Condado, Depto. de Santa Victoria, Salta, Argentina	Lab. Vavilov (FA-UBA)
Maíz Raza Amarillo Grande (2000 m)	VAV 6669	Molulo, Depto. Dr. Manuel Belgrano, Jujuy, Argentina	Lab. Vavilov (FA-UBA)
Maíz Raza Amarillo Chico (1690 m)	VAV 6476	Termas de Reyes, Depto. Dr. Manuel Belgrano, Jujuy, Argentina	Lab. Vavilov (FA-UBA)
Maíz Raza Blanco y Ocho Rayas (1250 m)	VAV 6483	Las Arcas, Depto. de Trancas, Tucumán, Argentina	Lab. Vavilov (FA-UBA)
Maíz Raza Calchaquí (1120 m)	ARZM08068	Buena Vista, Depto. de Guachipas, Salta, Argentina	INTA Pergamino
Maíz Raza Orgullo Cuarentón (910 m)	VAV 6482	La Candelaria, Dept. de La Candelaria, Salta, Argentina.	Lab. Vavilov (FA-UBA)
Maíz Línea (0 m)	13043	Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina	FA-UBA
<i>Zea luxurians</i> (900 m)	cv. 2228	Guatemala	Dra. C. Prywer
<i>Zea diploperennis</i> (1860 m)	cv. 2232	San Miguel, Ciudad Guzmán, Jalisco, México	Dra. C. Prywer
<i>Zea mays</i> ssp. <i>parviflumis</i> (590 m)	cv. 8391	Valle del Río Balsas, Guerrero, México	CIMMYT
<i>Zea mays</i> ssp. <i>mexicana</i> (1860 m)	KG-04-2	Chalco-Amecameca, Mesa Central, México	Dr. A. T. Kato Yamakake
<i>Zea perennis</i> (2120 m)	cv. 2257	Piedra Ancha, San Gabriel, Jalisco, México	Dra. C. Prywer

FA-UBA = Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires; INTA = Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; CIMMYT = Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo.

Obtención y marcado de las sondas knobs

Las secuencias repetitivas 180-pb y TR-1 (Peacock *et al.*, 1981; Ananiev *et al.*, 1998a) de los segmentos heterocromáticos del *knob* de maíz fueron obtenidas del banco de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Con el programa “Primer3” 0.6 (Rozen y Skaletsky, 2000) se diseñaron los cebadores para amplificar las dos secuencias componentes de los *knobs*. Luego se ordenó la síntesis de estos cebadores, cuyas secuencias fueron: para 180-pb (S: 3' ATAGCCAT-GAACGACCAT 5' y A: 5' ACCCCCACATATGTTCCCT 3'), y para TR-1 (S: 3' TCAACTTTAAACCACAAATGATG 5' y A: 5' GTTTGGACAGTTCACTCATGCA 3'), en Promega®.

Para hacer las mezclas de amplificación se colocaron 5 µL de una dilución de ADN genómico de maíz de la raza Amarillo Chico (50 a 100 ng), 10 µL de una mezcla de nucleótidos (dNTPs) (200 µM de cada dNTP), 3 µL de ClMg (2.5 mM), 0.25 µL de enzima *Taq* polimerasa (1 unidad), 3

µL de amortiguador 10 X de *Taq*, 5 µL de una dilución de cada cebador (1 µM de cada uno) y agua destilada estéril hasta un volumen de 30 µL.

La amplificación se hizo en un termociclador con el siguiente programa: 1 ciclo de 4 min a 94 °C, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 47 °C y 1 min a 72 °C, y 1 ciclo de 1 min a 72 °C. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en un gel 0.8 % de agarosa. Las secuencias amplificadas se extrajeron del gel con QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN®) según las instrucciones del fabricante. El marcado de las sondas se hizo con Dig-High Prime y Biotin-Nick Translation Mix (Roche®), según las instrucciones de los fabricantes.

Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

La técnica se aplicó según González *et al.* (2004). Los preparados se pretrataron con una dilución 1:100 de RNAsa (10 mg mL⁻¹) en el amortiguador de citrato sodico-ClNa

2XSSC (*Saline-Sodium Citrate*) por 1 h, se incubaron en p-formaldehído 4 % (p/v) por 10 min, se lavaron tres veces en 2 x SSC por 5 min cada vez, se deshidrataron en una serie alcohólica de etanol (70°, 90° y 100° durante 3 min por cada graduación) y se secaron al aire.

Para la mezcla de hibridación se colocaron: 15 µL de formamida pura, 6 µL de sulfato de dextrano, 3 µL de amortiguador 20XSSC, 1 µL de SDS 10 %, 1 µL de ADN de esperma de salmón y 100 a 200 ng de la secuencia *knob* marcada. Se añadieron 30 µL de la mezcla de hibridación a cada una de las preparaciones. Las mismas se colocaron en un termociclador con el siguiente programa: 7 min a 75 °C, 30 s a 55 °C, 1 min a 45 °C, 2 min a 42 °C, 5 min a 40 °C y 5 min a 38 °C. Despues se incubaron en estufa a 37 °C en una cámara húmeda, durante 12 h.

Los lavados posteriores a la hibridación se efectuaron con agitación y en condiciones de alta astringencia, en las cuales sólo permanecen hibridadas las secuencias que superan el 85 % de homología entre sí. Las condiciones de lavado fueron los siguientes: 2 x SSC a 42 °C por 5 min, formamida deionizada a 20 % (v/v) en 0.1 x SSC a 42 °C por 10 min, 0.1 x SSC a 42 °C durante 5 min, 4 x SSC/Tween (0.2 %) a 42 °C por 5 min, y 4 x SSC/Tween (0.2 %) a 20 °C durante 5 min.

Sobre cada preparación se colocaron 100 uL de amortiguador de detección: BSA (álbumina bovina) a 5 % (p/v) en 4 x SSC/Tween 20, y se incubaron a 25 °C por 5 min. La detección se realizó al agregar a cada preparación 50 µL de una solución a 2 % (v/v) de antídigoxygenina-FITC en BSA 5 % y Streptavidina-Cy3 0.2 % (v/v) en BSA 5 %, para detectar las sondas marcadas con digoxigenina y biotina respectivamente. Las preparaciones se incubaron a 37 °C en cámara húmeda y en oscuridad por 1 h y se lavaron tres veces en 4 x SSC/Tween (0.2 %) a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 min. Finalmente se tiñeron con 100 µL de 4', 6'-diamino-2-fenilindol (DAPI) (1 µg mL⁻¹ en amortiguador citrato McIlvaine pH 7) por 30 min, se lavaron rápidamente en 4 x SSC y se montaron con una gota de Vectashield®.

Las preparaciones se examinaron con microscopio de epifluorescencia (Axiphot, Carl Zeiss®) y las microfotografías se tomaron con una cámara digital (CCD, Leica®). Las imágenes fueron integradas con el programa Adobe Photoshop CS2 v 9.0 (Adobe Systems Incorporated®, USA).

RESULTADOS

En núcleos interfásicos de diferentes accesiones de maíz y teocintle se evidenció el número de regiones DAPI+ mediante tinción con DAPI, mientras que en metafases mitóticas con esta tinción se observó el número de bandas

DAPI+. En los casos en los que se analizaron metafases mitóticas se observó que en los distintos maíces la posición cromosómica de las bandas DAPI+ es principalmente sub-terminal al igual que en *Z. m. ssp. parviglumis* y *Z. m. ssp. mexicana*, mientras que en *Z. luxurians* y en *Z. diploperennis* es terminal (Figura 1, G-K).

El FISH con el uso simultáneo de las secuencias *knobs* 180-pb y TR-1 como sondas, reveló la constitución de secuencias en cada región/banda DAPI+ (Figura 1 y Cuadro 2). Se observaron *knobs* (regiones/bandas DAPI+) compuestos exclusivamente por la secuencia 180-pb, otros formados solamente por la secuencia TR-1, y *knobs* constituidos por ambas secuencias, las que mostraron estar en yuxtaposición y tener diferente proporciones relativas en la constitución de diferentes *knobs*. En el Cuadro 2 se muestra el patrón observado para cada accesión en cuanto al número y constitución de secuencia de sus *knobs*.

En núcleos y metafases del maíz de la raza Blanco y Ocho Rayas (accesión: VAV 6483) se observaron 13 regiones DAPI+ (Figura 1, A). Todas estas regiones hibridaron con la secuencia 180-pb marcada con biotina (Figura 1, B), de las cuales sólo tres presentaron además señal de hibridación positiva con la secuencia TR-1 marcada con digoxigenina (Figura 1, C).

En la raza de maíz Amarillo Chico (accesión: VAV 6451), la secuencia TR-1 hibridó en forma exclusiva sobre dos de las 15 regiones DAPI+ observadas, mientras que la secuencia 180-pb hibridó en 11 de estas regiones y sólo dos mostraron señal de hibridación con ambas secuencias. En otra población de la misma raza (accesión: VAV 6476), colectada en otra localidad a diferente altitud, se observaron diferencias con respecto a la población anterior. Amarillo Chico (accesión: VAV 6476) presentó 12 bandas DAPI+, de las cuales seis hibridaron exclusivamente con la secuencia 180-pb y las otras seis mostraron señales de hibridación con ambas secuencias *knob*.

Al hibridar núcleos interfásicos del maíz Orgullo Cuarentón (accesión: VAV 6482) se observaron 15 regiones DAPI+ (Figura 1, D), de las cuales dos presentaron señales de hibridación positiva sólo con la secuencia TR-1 marcada con biotina (Figura 1, E), cinco con la secuencia 180-pb marcada con digoxigenina (Figura 1, F), y otras ocho mostraron señales de hibridación con ambas secuencias (Figura 1, E y F).

En la raza de maíz Calchaquí (accesión: ARZM08068) los núcleos interfásicos mostraron ocho regiones DAPI+, de las cuales cuatro hibridaron exclusivamente con la secuencia 180-pb y las cuatro restantes con ambas secuencias *knob*. La intensidad de hibridación de la secuencia

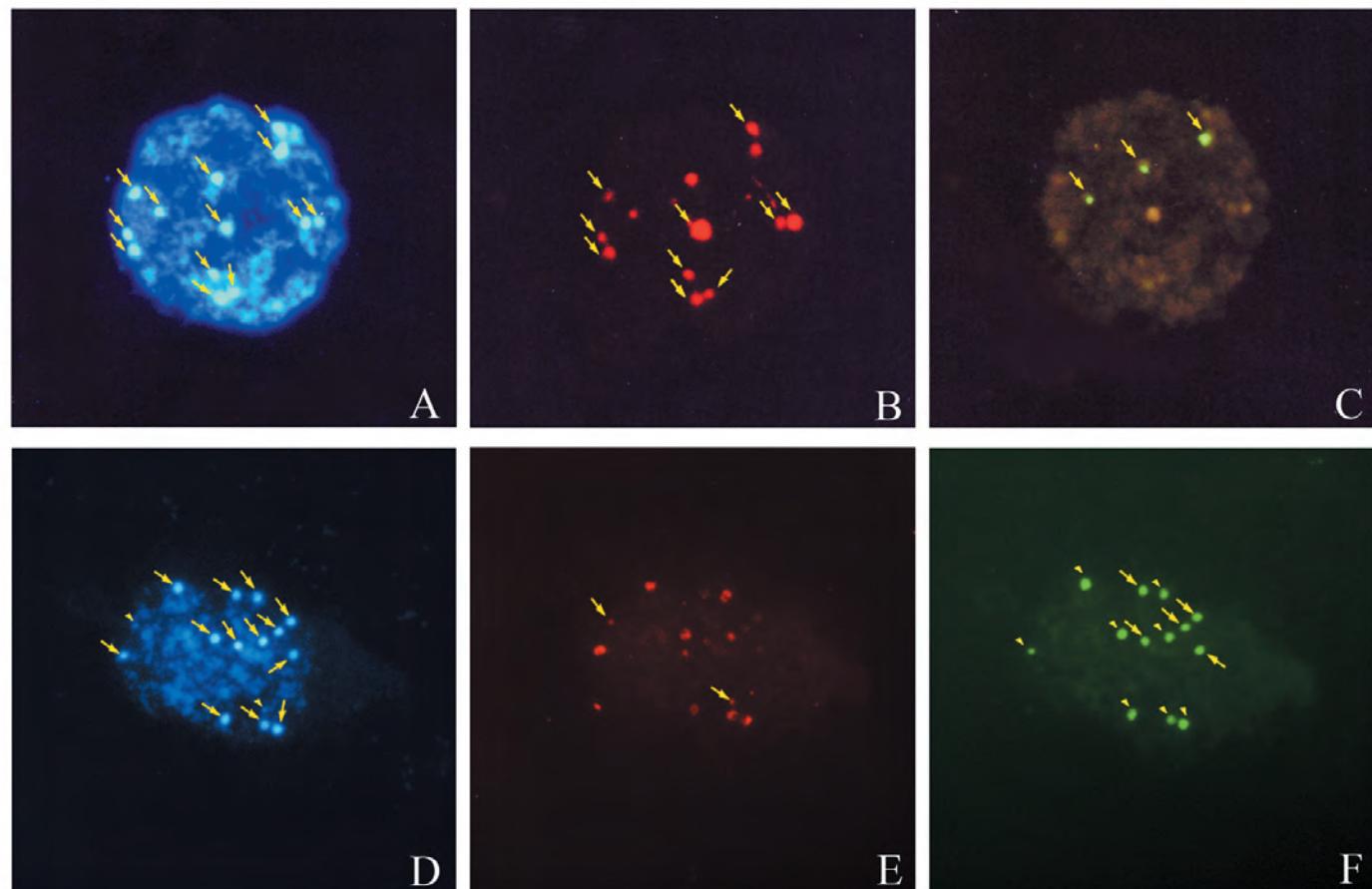


Figura 1 (A-F). A-C: Núcleo interfásico de la raza de maíz Blanco y Ocho Rayas (accesión: VAV6483). A: tinción DAPI (azul); las flechas indican las regiones DAPI+. B: FISH con sonda de secuencia 180-pb marcada con biotina y detectada con Cy3 (rojo); las flechas señalan los *knobs* hibridados exclusivamente con la secuencia 180-pb. C: FISH con sonda de secuencia TR-1 marcada con digoxigenina y revelada con antidiogoxigenin-FITC; las flechas muestran los *knobs* hibridados positivamente (verde). D-F: Núcleo interfásico de la raza de maíz Orgullo Cuarentón (accesión VAV6482). D: tinción DAPI; las flechas señalan 13 regiones DAPI+ conspicuas y las puntas de flecha muestran dos señales DAPI+ débiles. E: FISH con sonda de secuencia TR-1 marcada con biotina y detectada con Cy3 (rojo); las flechas indican los *knobs* hibridados exclusivamente con la secuencia TR-1. F: FISH con sonda de secuencia 180-pb marcada con digoxigenina y revelada con antidiogoxigenin-FITC; las flechas muestran los *knobs* hibridados exclusivamente con la secuencia 180-pb, y las puntas de flechas indican el resto de los *knobs* que fueron hibridados con dicha secuencia (verde).

TR-1 sobre una de estas últimas cuatro regiones fue menor que la intensidad de hibridación de la secuencia 180-pb. Las interfases del maíz raza Capia Blanco (accesión: ARZM09291) también presentaron ocho regiones DAPI+, pero sólo dos de ellas hibridaron únicamente con la secuencia 180-pb, otras dos hibridaron sólo con la secuencia TR-1 y las cuatro restantes con ambas secuencias. Las señales de hibridación con la secuencia 180-pb resultaron ser de mayor tamaño y más intensas que las señales de hibridación de la secuencia TR-1.

En los experimentos de FISH hechos sobre núcleos interfásicos y metafases mitóticas del maíz de la raza Amarillo Grande (accesión: VAV 6669) se observaron 11 bandas DAPI+, de las cuales dos mostraron señal de hibridación exclusivamente con la secuencia 180-pb (marcada con digoxigenina), una hibridó únicamente con la secuencia TR-1 (marcada con biotina) y las ocho restantes mostraron señales de hibridación con ambas secuencias. Dos de estas últimas se localizaron sobre los satélites que se encuentran en el par cromosómico 6 (Figura 1, G).

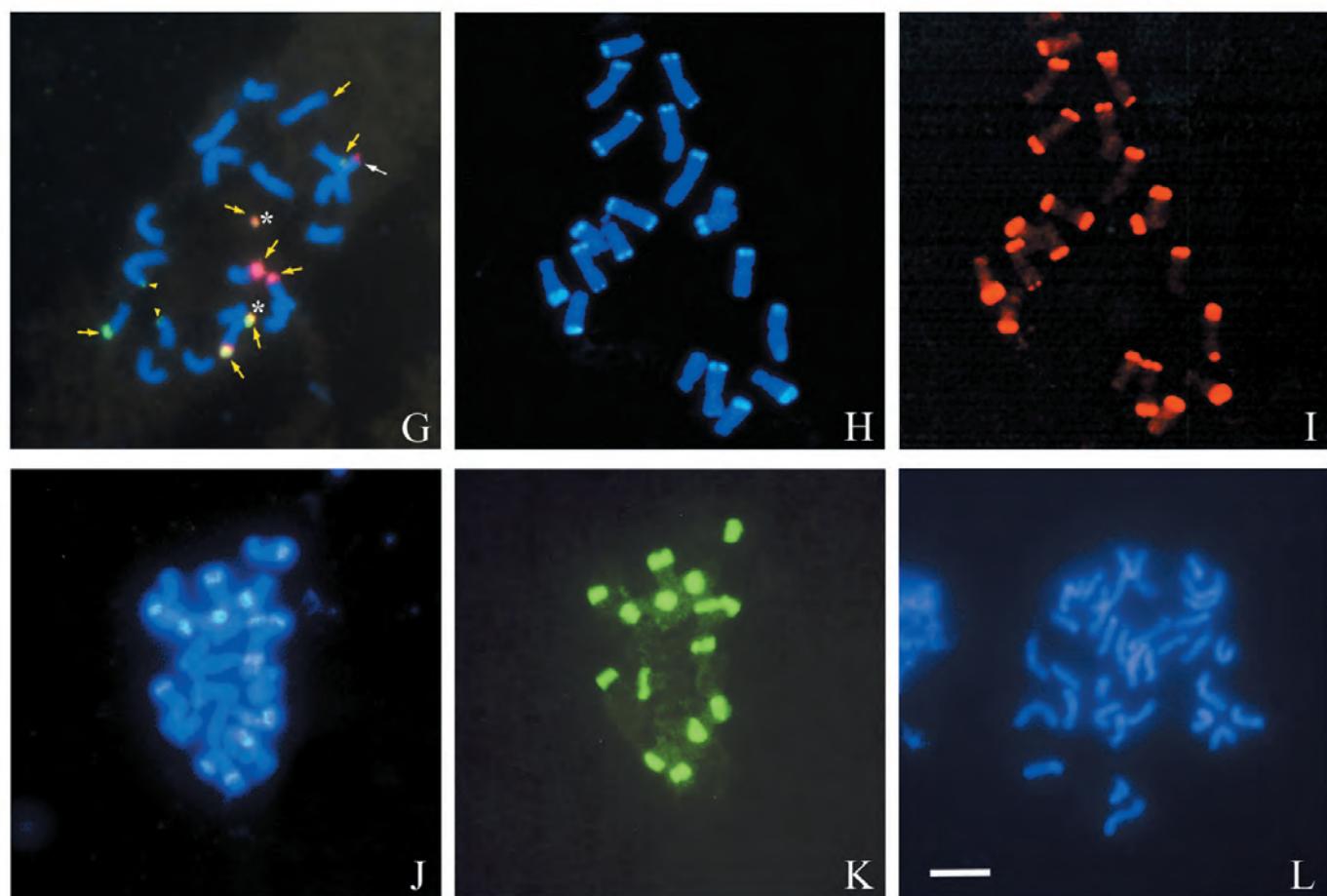


Figura 1 (Continuación G-L). G: Metafase mitótica de la raza de maíz Amarillo Grande (accesión: VAV 6669) teñida con DAPI (azul) e hibridada con sonda de secuencia TR-1 marcada con biotina (detectada con Cy3, rojo) y con sonda de secuencia 180-pb marcada con digoxigenina (revelada con antidigoxigenin-FITC, verde); los asteriscos marcan el par de satélites, las flechas amarillas muestran los *knobs* hibridados con ambas secuencias, las puntas de flecha señalan los *knobs* hibridados exclusivamente con la secuencia 180-pb, y la flecha blanca indica el *knob* que hibridó sólo con la secuencia TR-1. H-I: Metafase mitótica de *Zea luxurians*. H: Tinción con DAPI (azul). I: FISH con sonda de secuencia 180-pb marcada con biotina y detectada con Cy3 (rojo). J-K: Metafase mitótica de *Zea mays* ssp. *parviflora*. J: tinción con DAPI (azul). K: FISH con sonda de secuencia 180-pb marcada con digoxigenina y revelada con antidigoxigenin-FITC (verde). L: Tinción con DAPI de metafase mitótica de *Zea perennis* (azul). Barra: 10 μ m.

Las metafases mitóticas de la línea de maíz 13 043 mostraron 10 bandas DAPI+, las cuales hibridaron positivamente con la secuencia 180-pb. Únicamente cuatro de ellas mostraron señales de hibridación con la secuencia TR-1. Las mismas fueron de menor tamaño e intensidad que las de la secuencia 180-pb. Además, dos de estos *knobs*, compuestos por ambas secuencias, fueron localizados sobre los satélites del par cromosómico 6.

En cuanto a los resultados obtenidos en los teocintles, la tinción DAPI reveló que *Z. luxurians* posee la mayor cantidad de bandas DAPI+ (26 a 28) y que son de mayor tamaño que en maíz y en el resto de los teocintles (Figura 1, H). Por su parte, *Z. m. ssp. parviflora* mostró 14 a 15 bandas DAPI+ (Figura 1, J), *Z. m. ssp. mexicana* exhibió ocho re-

giones DAPI+, *Z. diploperennis* mostró 16 bandas DAPI+, y *Z. perennis* no presentó estas bandas (Figura 1, L).

Al aplicar el método FISH sobre metafases mitóticas de *Z. luxurians* y *Z. m. ssp. parviflora*, con el empleo de la secuencia *knob* 180-pb como sonda, se observaron fuertes señales de hibridación sobre todas las bandas DAPI+ (Figura 1, H-K). El mismo experimento realizado sobre *Z. m. ssp. mexicana* reveló que de sus ocho regiones DAPI+ dos no presentaron señales de hibridación y las seis restantes mostraron señales de hibridación de baja intensidad.

Los experimentos de FISH en los que se hibridaron simultáneamente las secuencias 180-pb (marcada con digoxigenina) y TR-1 (marcada con biotina) sobre metafases

Cuadro 2. Número de bandas/regiones DAPI+, número de *knobs* compuestos exclusivamente por la secuencia 180-pb, número de *knobs* constituidos únicamente por la secuencia TR-1, y número de *knobs* compuestos por ambas secuencias, en cada accesión.

Materiales de <i>Zea</i> (altitud de cultivo)	Bandas DAPI+	180-pb	TR-1	180 pb+TR-1
Maíz Raza Amarillo Chico (VAV6451) (2000 m)	15	11	2	2
Maíz Raza Orgullo Cuarentón (VAV6482) (910 m)	15	5	2	8
Maíz Raza Amarillo Chico (VAV6476) (1690 m)	12	6	0	6
Maíz Raza Blanco y Ocho Rayas (VAV6483) (1250 m)	13	10	0	3
Maíz Raza Amarillo Grande (VAV6669) (2000 m)	11	2	1	8
Maíz Raza Calchaquí (1120 m)	8	4	0	4
Maíz Raza Capia Blanco (2800 m)	8	2	2	4
Maíz Línea 13043 (0 m)	10	6	0	4
<i>Zea luxurians</i> cv. 2228 (900 m)	26-28	26-28	0	s/d
<i>Zea mays</i> ssp. <i>mexicana</i> Mesa Central KG-04-2 (1860 m)	8	6	s/d	s/d
<i>Zea mays</i> ssp. <i>parviglumis</i> Balsas cv. 8391 (590 m)	14-15	14-15	0	0
<i>Zea diploperennis</i> San Miguel cv. 2232 (1860 m)	16	0	0	16
<i>Zea perennis</i> Piedra Ancha cv. 2257 (2120 m)	0	0	0	0

mitóticas de *Z. diploperennis* y de *Z. perennis*, en la primera especie mostraron señales de hibridación de similar intensidad con ambas secuencias en todas las bandas DAPI+; mientras que en la segunda especie los cromosomas no presentaron bandas DAPI+ ni señales de hibridación (Figura 1, L).

DISCUSIÓN

En *Zea* la heterocromatina forma bloques citológicamente observables denominados nudos cromosómicos (*knobs*, en inglés) (Kato, 1976; McClintock, 1978). Estos bloques se encuentran principalmente en posición subterminal en el maíz, en *Z. m. ssp. mexicana* y *Z. m. ssp. parviglumis*, y terminal en *Z. luxurians* y en *Z. diploperennis* (Kato, 1976; Kato y López, 1990). En este trabajo se analizó si las variaciones en la cantidad de regiones *knob* y en la composición de sus secuencias permiten una caracterización citogenética más completa de accesiones del género *Zea*. Para ello se utilizó una combinación de técnicas de citogenética clásica (tinción DAPI) y molecular (FISH).

La tinción con el fluorocromo DAPI, que identifica a los *knobs* como bandas/regiones DAPI+ (Poggio *et al.*, 1998; González y Poggio, 2011), mostró que su número es variable entre las accesiones analizadas. En los experimentos de FISH realizados en este trabajo, en los que se hibridaron simultáneamente las secuencias *knob* 180-pb y TR-1 sobre metafases o núcleos interfásicos de las accesiones estudiadas, se observó una co-localización de las regiones DAPI+ con las señales de hibridación. Estos experimentos permitieron detectar la o las secuencias componentes de cada región/banda DAPI+. Ambas secuencias se encontraron, combinadas o aisladas, en los distintos *knobs*.

Dentro de cada accesión de maíz estudiada se encontró constancia en el número y composición de secuencias *knobs*, pero esta característica fueron variables entre accesiones. En los individuos de la raza Amarillo Chico (accesión: VAV 6451) se observaron 15 regiones DAPI+ correspondientes a los *knobs*, que confirmaron los resultados de Poggio *et al.* (1998) y más recientemente de González y Poggio (2011).

En el presente trabajo se reveló además, la composición de secuencia de cada uno de estos *knobs*. En la raza Amarillo Chico (accesión VAV 6451) la tinción DAPI reveló 15 *knobs* al igual que en la raza Orgullo Cuarentón (accesión VAV 6482), pero la composición de secuencia de los mismos varió entre ambas accesiones. También, el mismo número de *knobs* pero con variación en la composición de secuencias de los mismos fue detectada entre las razas Calchaquí (accesión ARZM08068) y Capia Blanco (accesión ARZM09291). Estos resultados demuestran la utilidad de las técnicas de FISH en la diferenciación citogenética de accesiones de maíz.

Con los resultados obtenidos en maíz se observó que a menor altitud de cultivo los *knobs* estaban compuestos solamente por la secuencia 180-pb o en combinación con la secuencia TR-1, a excepción del maíz Orgullo Cuarentón que posee un par de *knobs* compuestos sólo por la secuencia

TR-1. La presencia de *knobs* constituidos exclusivamente por la secuencia TR-1 se observó solo en los maíces provenientes de mayores altitudes de cultivo. Estos datos plantean el interrogante de si la composición de los *knobs* estaría relacionada con las correlaciones inversas observadas por Rosato *et al.* (1998) y Poggio *et al.* (1998) entre el porcentaje de heterocromatina y la altitud de cultivo, o entre el porcentaje de heterocromatina y el número de cromosomas B. Para dilucidar este interrogante es necesario ampliar el número de accesiones a analizar, y estudiar en detalle el patrón de *knobs*, porcentaje de heterocromatina y número de cromosomas B en las razas de una región a distintas altitudes de cultivo, por ejemplo en el Noroeste de Argentina. La asociación entre número y constitución de secuencias de los *knobs* en relación con la altitud de cultivo, la convierte en un interesante modelo para el análisis del valor selectivo de estas regiones heterocromáticas.

En este trabajo se observó, mediante FISH con las secuencias *knobs*, que las regiones DAPI+ de mayor tamaño presentan señales de hibridación mayores y más intensas. Ananiev *et al.* (1998a), al hibridar cromosomas de maíz con la secuencia 180-pb, postularon una correlación positiva entre el tamaño de los *knobs* y la cantidad de repeticiones que los componen. Esto demuestra que los *knobs* que mostraron mayores y más intensas señales de hibridación están compuestos por un mayor número de repeticiones en *tandem* de las secuencias con las que fueron hibridadas.

En lo que respecta a teocintles, *Z. m. ssp. parviglumis*, considerado por varios autores como el antecesor del maíz (Buckler y Holstford, 1996; Matsuoka *et al.*, 2002), presentó un número elevado de *knobs* conspicuos. Todos ellos hibridaron intensamente con la secuencia 180-pb. Al hibridar la misma secuencia sobre núcleos interfásicos de otra accesión de *Z. m. ssp. parviglumis*, Poggio *et al.* (2005) observaron el mismo número de regiones DAPI+ pero algunas de ellas no tuvieron homología con la secuencia 180-pb. Esto muestra la variación que puede encontrarse entre accesiones de diferentes localidades.

En la accesión de *Z. m. ssp. mexicana* se observaron ocho *knobs*, y sólo seis estaban compuestos por la secuencia 180-pb. *Z. luxurians* mostró el mayor número y tamaño de *knobs* que en el resto de especies *Zea*. Los mismos se encontraron en posición terminal y en ambos brazos de la mayoría de los cromosomas. Todos estos *knobs* mostraron estar compuestos por la secuencia 180-pb puesto que presentaron fuertes señales de hibridación sobre todas las bandas DAPI+. Estos experimentos evidencian que *Z. luxurians* no posee *knobs* compuestos exclusivamente de TR-1. Estos resultados coinciden con los descritos recientemente por Albert *et al.* (2010) y González y Poggio (2011), y ponen de manifiesto que la secuencia TR-1 se encuentra poco representada en el genoma

de *Z. luxurians*. En *Z. diploperennis* se observaron proporciones similares de ambas secuencias en todos sus *knobs*, en coincidencia con los resultados de Albert *et al.* (2010).

En los experimentos de FISH *Z. perennis* no mostró bandas DAPI+ ni señales de hibridación con las secuencias 180-pb y TR-1. *Z. perennis* es la especie de *Zea* que posee el menor contenido de ADN por genoma básico (Tito *et al.*, 1991). Tampoco González *et al.* (2006) observaron señales de hibridación sobre los *knobs* del maíz al hibridar ADN genómico de esta especie sobre metafases mitóticas de maíz. Por tanto, nuestros resultados confirman la ausencia de estas secuencias en el genoma de *Z. perennis*, y sugieren que la disminución del contenido de ADN en el genoma básico de esta especie consistió principalmente en la pérdida de las secuencias repetitivas que constituyen los *knobs*. Esta pérdida sería una consecuencia del proceso de poliploidización secundaria de esta especie (Poggio *et al.*, 2005). Por el contrario, *Zea luxurians* posee el mayor contenido de ADN del género (Tito *et al.*, 1991) que podría explicarse por el mayor número y tamaño de *knobs* observados en esta especie.

El análisis conjunto de los resultados de las accesiones de maíz analizadas mostró que la mayor parte de los *knobs* estaban compuestos exclusivamente por la secuencia 180-pb, mientras que un número mucho menor solamente por TR-1. Asimismo, en los teocintles se detectó, con excepción de *Z. diploperennis*, una predominancia de *knobs* conformados por la secuencia 180-pb. La preponderancia de la secuencia de 180-pb podría deberse a que los elementos TR-1 evolucionaron a partir de repeticiones de 180-pb como resultado de una duplicación y subsecuente divergencia (Ananiev *et al.*, 1998b).

Los resultados de los experimentos de FISH aquí realizados sobre las metafases mitóticas indican que es posible elaborar cariotipos FISH propios de distintas accesiones de maíces y teocintles, lo que permitirá una caracterización citogenética más completa de *Zea*. Estas metodologías pueden extrapolarse también a la caracterización y reconocimiento de líneas e híbridos comerciales de maíz, como quedó demostrado con los resultados obtenidos para la línea 13043 aquí estudiada.

CONCLUSIONES

Las tinciones DAPI revelaron la existencia de variación en bandas/regiones heterocromáticas (*knobs*) sobre los cromosomas o núcleos interfásicos respectivamente, variación que es de utilidad para la caracterización de accesiones de *Zea*. Los resultados de FISH demostraron variación entre accesiones en el tipo de secuencias que componen los diferentes *knobs*. Con los patrones de hibridación diferenciales obtenidos fue posible discernir entre las accesiones tanto de

maíz como de teocintle aquí estudiadas, aportar datos para la caracterización citogenética y contribuir al conocimiento de la variabilidad genética del género.

La caracterización citogenética de maíces y teocintles mediante el estudio de sus *knobs*, es un procedimiento rápido y factible que vislumbra nuevas perspectivas para profundizar estudios biosistemáticos y establecer hipótesis acerca del origen y el valor adaptativo de las regiones heterocromáticas. Esta caracterización es un aporte al conocimiento de la variabilidad fenotípica y genotípica de los taxa del género *Zea*, por lo cual sería de utilidad e importancia su integración en programas de mejoramiento y de conservación de la biodiversidad.

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Agr. Julián Cámará-Hernández por proveer las accesiones analizadas de maíz y al Sr. Diego Fink por la asistencia técnica con el material fotográfico. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica-FONCYT (PICT-14119), a la Universidad de Buenos Aires (UBACYT: X-178) y al CONICET (PIP-0342) por el financiamiento de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Albert P S, Z Gao, T V Danilova, J A Birchler (2010)** Diversity of chromosomal karyotypes in maize and its relatives. *Cytogen. Genome Res.* 129:6-16.
- Ananiev E V, R L Phillips, H W Rines (1998a)** A knob associated tandem repeat in maize capable of forming fold-back DNA segments: are chromosome knobs megatransposons? *PNAS USA-Biol. Sci.* 95:10785-10790.
- Ananiev E V, R L Phillips, H W Rines (1998b)** Complex structure knob DNA of maize chromosome 9: Retrotransposon invasion into heterochromatin. *Genetics* 149:2025-2037.
- Buckler E S IV, T P Holtsford (1996)** *Zea* systematics: Ribosomal ITS evidence. *Mol. Biol. Evol.* 13:612-622.
- Cámará H J, D Arancibia de C (2007)** Maíces Andinos y sus Usos en la Quebrada de Humahuaca y Regiones Vecinas. 1a ed. Facultad de Agronomía-Universidad de Buenos Aires, Argentina. 60 p.
- Dennis E, W Peacock (1984)** Knob heterochromatin homology in maize and its relatives. *J. Mol. Biol.* 20:341-350.
- GenBank.** National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- González G, C Comas, V Confalonieri, C A Naranjo, L Poggio (2006)** Genomic affinities between maize and *Zea perennis* using classical and molecular cytogenetic (GISH-FISH). *Chromosome Res.* 14:629-635.
- González G, V Confalonieri, C Comas, C A Naranjo, L Poggio (2004)** GISH Genomic *in situ* hybridization reveals cryptic genetic differences between maize and its putative wild progenitor *Zea mays* subsp. *parviglumis*. *Genome* 47:947-953.
- González G, Poggio L (2011)** Karyotype of *Zea luxurians* and *Z. mays* subsp. *mays* using FISH/DAPI, and analysis of meiotic behavior of hybrids. *Genome* 54:26-32.
- Grobman A, W Salhuana, R Sevilla (1961)** Races of Maize in Perú: Their Origins, Evolution and Classification. National Academy of Sciences-National Research Council. Washington D. C., USA. 375 p.
- Kato T A, C Mapes S, L M Mera O, J A Serratos H, R A Bye B (2009)** Origen y Diversificación del Maíz: Una Revisión Analítica. Universidad Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 116 p.
- Kato T A, R López (1990)** Chromosome knobs of the perennial teosintes. *Maydica* 35:125-141.
- Kato T A (1976)** Cytological studies of maize (*Zea mays* L.) and teosinte (*Zea mexicana* Schrader Kuntze) in relation to their origin and evolution. *Mass. Agr. Exp. St. Res. Bull.* 635:1-185.
- Laurie D A, M D Bennett (1985)** Nuclear DNA content in the genera *Zea* and *Sorghum*: Intergeneric, intergeneric and intraspecific variation. *Heredity* 55:307-313.
- Longley A E (1938)** Chromosomes of maize from North American Indians. *J. Agron. Res.* 56:177-195.
- Matsuoka Y, V Vigouroux, M Goodman, J Sanchez, E Buckler, J F Doebley (2002)** A single domestication for maize shown by multi-locus microsatellite genotyping. *PNAS USA-Biol. Sci.* 99:6080-6084.
- McClintock B (1978)** Significance of chromosome constitutions in tracing the origin and migration of races of maize in the Americas. *Maize Breeding and Genetics*. D B Walden (ed). Wiley, N.Y. pp: 59-184.
- McClintock B, T A Kato, A Bluemenschein (1981)** Chromosome Constitution of Races of Maize. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. 521 p.
- Peacock W J, E S Dennis, M M Rhoades, A J Pryor (1981)** Highly repeated DNA sequences limited to knob heterochromatin in maize. *PNAS USA-Biol. Sci.* 78:4490-4494.
- Poggio L, G González, V Confalonieri, C Comas, C A Naranjo (2005)** The genome organization and diversification of maize and its allied species revisited: evidences from classical and FISH-GISH cytogenetic analysis. *Cytogenet. Genome Res.* 109:259-267.
- Poggio L, C A Naranjo (1990)** Contenido de ADN y evolución en plantas superiores. Acad. Nac. de Cs Ex. Fís. y Nat., Buenos Aires, Monografía 5:27-37.
- Poggio L, M Rosato, M Chiavarino, C A Naranjo (1998)** Genome size and environmental correlations in maize. *Ann. Bot.* 82:115-117.
- Ramírez R E, D H Timothy, E B Díaz, U J Grant (1960)** Races of Maize of Bolivia. National Academy of Sciences-National Research Council. Washington D. C.159 p.
- Rayburn A L, H J Price, J D Smith, J R Gold (1985)** C-band heterochromatin and DNA content variation in *Zea mays*. *Am. J. Bot.* 72:1610-1617.
- Roberts L M, U J Grant, E R Ramirez, W H Hathawy, D L Smith (1957)** Races of Maize in Colombia. National Academy of Sciences-National Research Council Publ. 510. Bogotá. 159 p.
- Rosato M, A Chiavarino, C A Naranjo, J Cámará H, L Poggio (1998)** Genome size and numerical polymorphism for B- chromosome in races of maize (*Zea mays* ssp. *mays*, Poaceae). *Am. J. Bot.* 85:168-174.
- Rozen S, H Skaletsky (2000)** Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132:365-386. Disponible en: http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html.
- Tito C, L Poggio, C A Naranjo (1991)** Cytogenetics studies in the genus *Zea*: DNA content and heterochromatin in species and hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 83:58-64.
- Wan Y, M Widholm (1992)** Chromosome knob number of somatic cell of five inbreds. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 66:178.
- Wellhausen E J, O Fuentes, A Hernández C (1957)** Races of Maize in Central America. National Academy of Sciences-National Research Council. México. 138 p.