

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE
VALENCIA**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL



**UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA**

**ESTUDIOS CITOGENÉTICOS
EVOLUTIVOS DEL GÉNERO ZEA**

Tesis doctoral presentada por:

Ing. Agr. María del Carmen Molina

Dirigida por:

Dr. Vicente Moreno Ferrero

2011

Don Vicente Moreno Ferrero Catedrático de Genética del Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia adscrito al Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (centro mixto UPV - CSIC).

Certifica:

Que la memoria titulada “Estudios ctogenéticos evolutivos del Género *Zea*” presentada por Dna. María del Carmen Molina Belver para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo ha sido realizada bajo su dirección.

Y para que así conste a todos los efectos y a petición de la persona interesada se expide el presente certificado en Valencia. Marzo del año 2010.

Vicente Moreno Ferrero

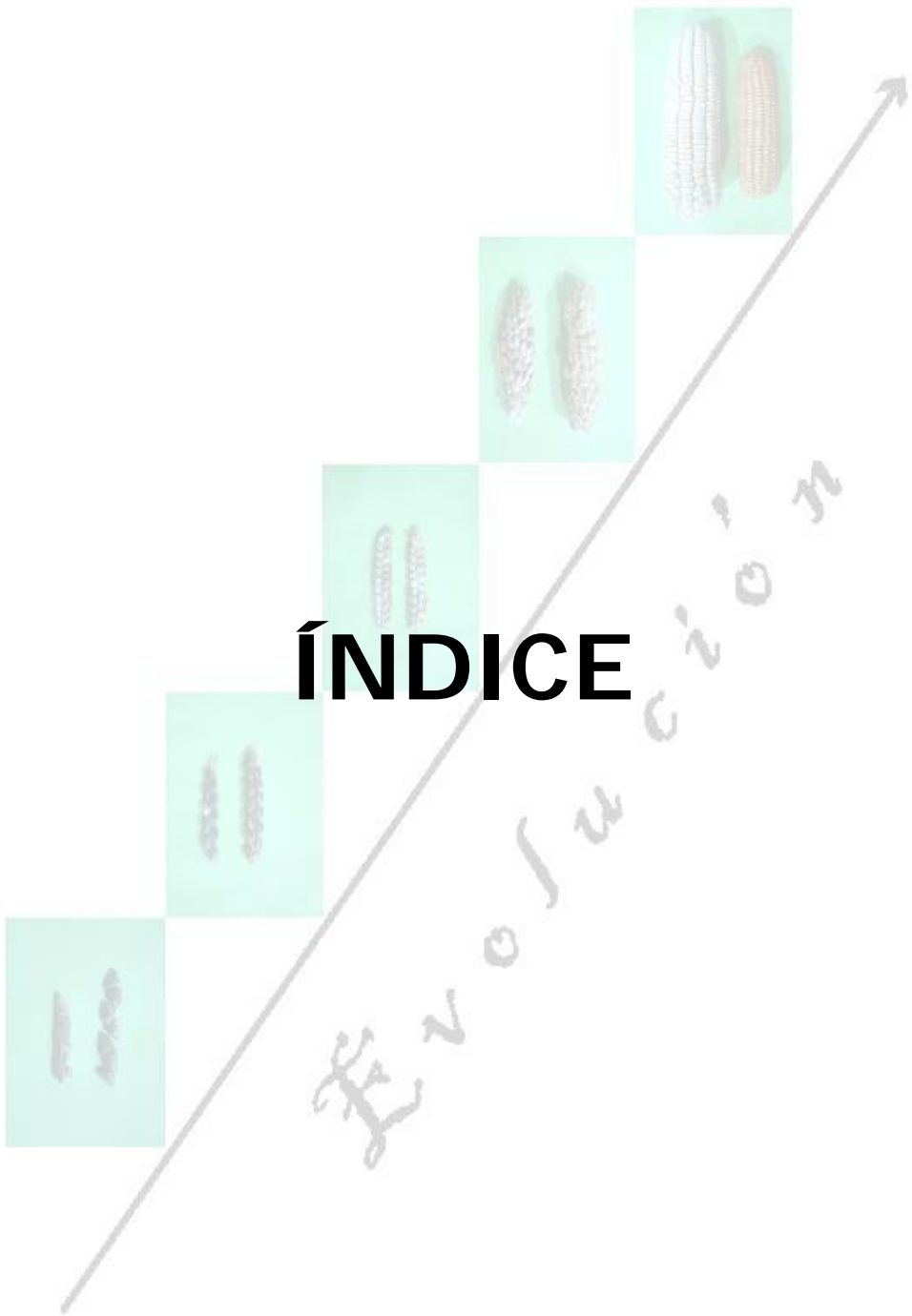
AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a la Universidad Politécnica de Valencia y a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora que a través de un Convenio de Cooperación Internacional han hecho posible que se plasmase la posibilidad de realizar la Especialidad y posteriormente el Doctorado.

Al personal del Instituto Fitotécnico de Santa Catalina, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de la Plata donde se ha llevado a cabo la investigación.

Al Dr. Vicente Moreno Ferrero por su permanente apoyo y buena predisposición para comprender y solucionar los problemas que se fueron planteando, como así mismo salvar los escollos que se presentaron al dirigir una tesis a distancia donde la comunicación con el doctorando es menos fluida.

Y muy especialmente a mi familia por su permanente aliento, comprensión y ayuda para que pudiese concretar mis deseos. Es por ello que dedico esta tesis a mi Esposo, Hijos, Nietos, Padres, Hermana y Sobrinos.



ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	18
RESUMEN.....	23
RESUM.....	28
ABSTRACT.....	33
INTRODUCCIÓN.....	38
1 Clasificación Científica del Género <i>Zea</i>	39
2 Número básico de las Maydeas.....	41
3 Distribución geográfica.....	41
4 Características morfológicas.....	42
5 Origen del maíz.....	44
5.1 La teoría del antecesor común.....	45
5.2 La teoría del anfidiplóide.....	45
5.3 La teoría del maíz papirescente.....	46
5.4 La teoría del maíz herbáceo.....	46
5.5 La teoría tripartita.....	46
5.6 La teoría del teosinte como antecesor del maíz.....	48
6 Estudios moleculares del origen del maíz.....	53
7 Estudios genómicos de <i>Zea</i>	56
8 Evidencias citológicas de ploidía en <i>Zea</i>	59
8.1 Apareamiento cromosómicos de haploides de maíz...	60
8.2 Apareamiento de cromosomas homeólogos.....	61
8.3 Asociación secundaria.....	62
8.4 Distribución tridimensional de los cromosomas en metafase mitótica.....	63
8.5 Genes duplicados.....	64
9 Homología críptica en <i>Zea</i>	66

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	71
1 Hipótesis de trabajo.....	72
2 Objetivos.....	72
2.1 Objetivos generales.....	72
2.2 Objetivos específicos.....	73
MATERIALES Y MÉTODOS.....	74
1 Materiales.....	75
1.1 Especies parentales.....	75
1.1.1 Sección <i>Zea</i>	75
1.1.2 Sección Luxuriante.....	75
1.2 Híbridos.....	76
1.2.1 Dihíbridos.....	76
1.2.1.1 Con $2n=20$	76
1.2.1.2 Con $2n=30$	76
1.2.1.3 Con $2n=40$	76
1.2.2 Trihíbridos.....	77
1.2.2.1 Con $2n=20$	77
1.2.2.2 Con $2n=40$	77
2 Métodos.....	77
2.1 Experimentos de campo.....	77
2.1.1 Autofecundaciones y cruzamientos utilizando al maíz como progenitor femenino.....	77
2.1.2 Cruzamientos utilizando como progenitor femenino a los teosintes.....	78
2.2 Fijación de panojas para estudios meióticos.....	78
2.3 Preservación de la semilla.....	78
2.4 Fertilidad del polen.....	78
2.5 Germinación <i>in vitro</i> del tubo polínico.....	79

2.6 Análisis citogenéticos.....	79
2.6.1 Preparaciones citológicas para estudios mitóticos.....	79
2.6.2 Preparaciones citológicas para estudios meióticos.....	80
2.6.3 Tratamiento con solución diluida de colchicina	80
2.6.4 Realización de cariotipo, idiograma y láminas.	80
2.7 Rescate de embriones maduros e inmaduros.....	81
2.7.1 Organogénesis.....	81
2.7.2 Embriogénesis somática.....	82
2.7.3 Iniciación del cultivo.....	82
RESULTADOS.....	83
1 Análisis comparativo de los cromosomas.....	84
2 Análisis de las afinidades cromosómicas de especies e híbridos del Género <i>Zea</i>	87
2.1 Especies parentales.....	87
2.1.1 Sección <i>Zea</i>	87
2.1.2 Sección Luzuriante.....	90
2.2 Híbridos.....	94
2.2.1 Dihíbridos.....	94
2.2.1.1 Dihíbridos con $2n=20$	94
2.2.1.2 Dihíbridos con $2n=20-30$	100
2.2.1.3 Dihíbridos con $2n=30$	102
2.2.1.4 Dihíbridos con $2n=30-40$	106
2.2.1.5 Dihíbridos con $2n=40$	110
2.2.2 Trihíbridos.....	111
2.2.2.1 Trihíbridos con $2n=20$	111
2.2.2.2 Trihíbridos con $2n=40$	114

3 Comportamiento meiótico de las especies e híbridos del Género <i>Zea</i> de acuerdo a su nivel de ploídia.....	115
4 Efecto de la solución diluida de la colchicina en el apareamiento críptico de los cromosomas del complejo <i>Zea</i>	118
4.1 En especies de <i>Zea</i> con $2n=20$	118
4.2 En híbridos de <i>Zea</i> con $2n=20$	118
4.3 En híbridos de <i>Zea</i> con $2n=30$	119
4.4 En especies e híbridos de <i>Zea</i> con $2n=40$	120
DISCUSIÓN.....	123
1 Longitud, relación entre los brazos y posición de los <i>knobs</i> en los cromosomas del Género <i>Zea</i>	124
2 Apareamiento cromosómico en especies e híbridos del Género <i>Zea</i>	130
3 Efecto del número cromosómico en las características fenotípicas de los híbridos.....	134
4 Apareamiento críptico de los cromosomas homeólogos en el Género <i>Zea</i>	137
TABLAS Y FIGURA.....	143
1 Tablas.....	144
2 Figuras.....	162
CONCLUSIONES.....	188
BIBLIOGRAFÍA.....	193
ANEXO.....	216
1 Técnicas citogenéticas.....	217
1.1 Hematóxilina acética.....	217
1.2 Carmín acético.....	217
1.3 Mordiente de citrato férrico.....	217
1.4 Buffer ácido cítrico-citrato de sodio pH 4,8.....	217
1.5 Solución enzimática de celulasa y pectinasa.....	218

1.6 Buffer Mc Ilvaine pH 7.....	218
1.7 Solución saturada de Paradiclorobenceno.....	218
1.8 Solución de 0,45 mM de 2,4-D.....	218
1.9 Solución de $0,5 \times 10^{-4}$ M de colchicina.....	218
2 Medio de cultivo para la germinación <i>in vitro</i> del grano del grano de polen.....	219
3 Medio de cultivo para la regeneración de embriones inmaduros.....	219
3.1 Composición del medio de cultivo.....	219
3.2 Procedimiento.....	220
3.2.1 Preparación de las soluciones madres.....	220
3.2.2 Preparación y esterilización del medio de cultivo.....	221
4 Rescate y cultivo <i>in vitro</i> de embriones inmaduros de maíz e híbridos.....	222
4.1 materiales.....	222
4.2 Procedimiento.....	223
4.2.1 Preparación del material vegetal.....	223
4.2.2 Desinfección.....	223
4.2.3 Preparación del explanto.....	223
4.2.4 Siembra.....	223
4.2.5 Incubación.....	224
4.2.6 Aclimatación y transplante.....	224

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Soluciones madres del medio N6, utilizadas para el cultivo de embriones inmaduros de híbridos de <i>Zea</i>	219
Tabla 2: Volumen de las soluciones madres a agregar para preparar 1000 ml del medio de cultivo para embriones inmaduros de <i>Zea</i>	221
Tabla 3. Composición del medio de mantenimiento de callos de maíz.....	222
Tabla 4. Composición del medio de enraizamiento de plantas de maíz.....	223
Tabla 5: Longitud relativa de los cromosomas de las especies del Género <i>Zea</i>	223
Tabla 6: Relación entre los brazos de los cromosomas del Género <i>Zea</i>	144
Tabla 7: Posición de los <i>knobs</i> en los cromosomas del Género <i>Zea</i>	145
Tabla 8: Configuraciones meióticas de <i>Zea mays</i> ssp <i>mays</i> con $2n=20$	146
Tabla 9: Configuraciones meióticas de <i>Zea mays</i> ssp <i>mays</i> con $2n=40$	147
Tabla 10: Configuraciones meióticas de <i>Zea mays</i> ssp <i>mexicana</i> observadas en diacinesis-metafase I.....	147
Tabla 11: Configuraciones meióticas observadas en <i>Zea mays</i> ssp <i>parviglumis</i> con $2n=20$	147
Tabla 12: Configuraciones meióticas observadas en diacinesis - metafase I en <i>Zea luxurians</i>	148
Tabla 13: Configuraciones meióticas observadas en diacinesis- metafase I en <i>Zea diploperennis</i>	148
Tabla 14: Configuraciones meióticas observadas en diacinesis-	

metafase I de un clon de <i>Zea perennis</i>	148
Tabla 15: Configuraciones meióticas en diacinesis-metafase I del híbrido entre <i>Zea mays</i> y <i>Zea mexicana</i>	149
Tabla 16: Configuraciones meióticas del híbrido entre <i>Zea mays</i> por <i>Zea luxurians</i> con $2n=20$	149
Tabla 17: Configuraciones meióticas en diacinesis-metafase I del híbrido de <i>Zea mays</i> x <i>Zea diploperennis</i> con $2n=20$	150
Tabla 18: Configuraciones meióticas en diacinesis-metafase I del híbrido entre <i>Zea diploperennis</i> por <i>Zea luxurians</i>	150
Tabla 19: Configuraciones meióticas en diacinesis-metafase I del híbrido entre <i>Zea mays</i> por <i>Zea parviglumis</i> con $2n=20$	150
Tabla 20: Configuraciones meióticas en diacinesis-metafase I del híbrido entre <i>Zea mays</i> ($2n=40$) por <i>Zea parviglumis</i> con $2n=20$ teniendo el híbrido ($Zm \times Zpar30$) un número cromosómico de $2n=30$	151
Tabla 21: Configuraciones meióticas en diacinesis-Metafase I del híbrido entre <i>Zea mays</i> ($2n=40$) por <i>Zea mays</i> ($2n=20$)	151
Tabla 22: Configuraciones meióticas del híbrido entre <i>Zea perennis</i> por <i>Zea mexicana</i> con $2n=30$	152
Tabla 23: Configuraciones meióticas en diacinesis-Metafase I del híbrido <i>Zea luxurians</i> por <i>Zea perennis</i>	152
Tabla 24: Resultados del cruzamiento de diferentes líneas de maíz con $2n=40$ (progenitor femenino) por <i>Zea perennis</i>	153
Tabla 25: Características fenotípicas y fertilidad del polen en híbridos de <i>Zea mays</i> y <i>Zea perennis</i> con diferente nivel de ploidía.....	153
Tabla 26: Configuraciones meióticas del híbrido entre <i>Zea mays</i> ssp. <i>mays</i> por <i>Zea perennis</i> con $2n=30$	154

Tabla 27: Configuraciones meióticas del híbrido entre <i>Zea mays</i> (2n=40) por <i>Zea perennis</i> con 2n=40.....	154
Tabla 28: Configuraciones meióticas del híbrido entre <i>Zea diploperennis</i> x <i>Zea perennis</i> con 2n=30.....	155
Tabla 29: Configuraciones meióticas del híbrido entre <i>Zea diploperennis</i> por <i>Zea perennis</i> con 2n=40.....	155
Tabla 30: Configuraciones meióticas del híbrido entre <i>Zea parviglumis</i> por <i>Zea diploperennis</i> con 2n=40.....	156
Tabla 31: Configuraciones meióticas del híbrido (<i>Zea mays</i> x <i>Zea diploperennis</i>) x <i>Zea luxurians</i> (MDL) con 2n=20	157
Tabla 32: Configuraciones meióticas del trihíbrido <i>Zea mays</i> con 2n=40 por <i>Zea diploperennis</i> x <i>Zea perennis</i> con 2n=40 (MDP) teniendo el trihíbrido un número cromosómico de 2n=40.....	157
Tabla 33: Promedio de univalentes (I), bivalentes (II), trivalentes (III), tetravalentes (IV), quiasmas, fertilidad del polen y de la semilla en especies e híbridos del Género <i>Zea</i>	158
Tabla 34: Configuraciones meióticas más frecuentes en especies e híbridos del Género <i>Zea</i>	159
Tabla 35: Comparación del tamaño de los cromosomas de las especies de <i>Zea</i> con 2n=20 y los de <i>Zea perennis</i> , considerando en esta última especie como si fuese un solo cromosoma a los pares cromosómico 1-2; 3-4; 7-8; 9-10 y 15-16 por tener igual tamaño y relación entre los brazos.....	160
Tabla 36: Comparación de la relación entre los brazos de los cromosomas de especies de <i>Zea</i> con 2n=20 y los de <i>Zea perennis</i>	161

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución geográfica de los Teosintes en Méjico.....	162
Figura 2: a) espiga de maíz, b) espiga dística de teosinte.....	162
Figura 3: a) grano de maíz, b) cariopse de Teosinte.....	163
Figura 4: Cromosomas en paquiteno observándose la posición de los <i>knobs</i> en especies del Género <i>Zea</i> : A) <i>Knobs</i> subterminales en <i>Zea mays</i> ; B) <i>Knobs</i> terminales en Teosinte.....	163
Figura 5: Especies del Género <i>Zea</i> : A) <i>Zea mays</i> ; B) <i>Zea mexicana</i> ; C) <i>Zea parviglumis</i> ; D) <i>Zea luxurians</i> ; E) <i>Zea diploperennis</i> ; F) <i>Zea perennis</i>	164
Figura 6: Cariotipo de las distintas especies de <i>Zea</i> comparando la longitud total de los cromosomas y la relación entre sus brazos. Los cromosomas con una marca en el brazo corto son los organizadores del nucleolo.....	165
Figura 7: Plantas de maíz con anomalías en la panoja y la espiga; A) Espiga en lugar de la panoja, B) Espiga y panoja simultáneas, C) Varias espigas en el mismo nudo reproductivo.....	166
Figura 8: Configuraciones meióticas de <i>Zea mays</i> con $2n=20-40$: A) Cromosomas separados en dos grupos de 5 cromosomas cada uno; B) Anafase normal en <i>Z. mays</i> con $2n=20$; C) <i>Z. mays</i> con $2n=40$ se observan $8IV+4II$; D) Anafase normal en <i>Z. mays</i> con $2n=40$	166
Figura 9: Configuraciones meióticas de <i>Zea mexicana</i> : A) Cromosomas en paquiteno; B) cromosomas separados en dos grupos de 5 cromosomas; C) Configuración meiótica de $9II+2I$; D) Anafase normal;	

E) Anafase con un puente de inversión; F) Anafase con cromosomas retrasados.....	167
Figura 10: Configuraciones meióticas de <i>Z. diploperennis</i> ; A) Cromosomas en paquiteno, B) 10II, C) Anafase normal, D) Anafase con cromosomas retrasados.....	168
Figura 11: Célula de <i>Zea perennis</i> en paquiteno observándose 10II + 5IV con dos cromosomas organizadores del nucleolo.....	168
Figura 12: Plantas de híbridos con $2n=20$: A) <i>Z. mays</i> x <i>Z. mexicana</i> ; B) <i>Z. mays</i> x <i>Z. luxurians</i> ; C) <i>Z. mays</i> x <i>Z. diploperennis</i> con $2n=20$; D) <i>Z. diploperennis</i> x <i>Z. luxurians</i>	169
Figura 13: Configuraciones meiótica del híbrido <i>Z. mays</i> x <i>Z. mexicana</i> : A) 10II; B) 9II+2I; C) Anafase normal; D) Anafase con puente de inversión.....	170
Figura 14 : Configuraciones meióticas del híbrido <i>Z. mays</i> x <i>Z. diploperennis</i> con $2n=20$: A) cromosomas mitóticos con $2n=20$; B)10II; C) anafase normal; D) anafase con puente de inversión.....	171
Figura 15: Configuraciones meióticas en diacinesis-metafase I de los híbridos entre <i>Z.mays</i> x <i>Z. parviglumis</i> con $2n=20$ y <i>Z.mays</i> x <i>Z. parviglumis</i> con $2n=30$: A) <i>Z.mays</i> con $2n=20$ (10II), B) <i>Z.mays</i> con $2n=40$ (10IV), C) <i>Z. parviglumis</i> (10II), D) <i>Z.mays</i> x <i>Z. parviglumis</i> con $2n=20$ (10II), E) <i>Z.mays</i> x <i>Z. parviglumis</i> con $2n=20$ (8II+1IV), F) Anafase con cromosomas retrasados en <i>Z.mays</i> x <i>Z. parviglumis</i> con $2n=20$, G) Anafase con un puente de inversión en <i>Z.mays</i> x <i>Z. parviglumis</i> con $2n=20$, H) <i>Z.mays</i> x <i>Z. parviglumis</i> con $2n=30$ (5III+5II+5I), I) Anafase del híbrido <i>Z.mays</i> x <i>Z.</i>	

<i>parviglumis</i> con $2n=30$ migrando distinto número de cromosomas hacia cada polo.....	172
Figura 16: Configuraciones meióticas de <i>Zea mays</i> ssp <i>mays</i> con $2n=30$: A) Metafase con 10 trivalentes; B) Metafase con 9 trivalentes 1 bivalente y 1 univalente. Se observa un cromosoma que forma un pequeño nucleolo. C) metafase con 6 trivalentes, 4 bivalentes y 4 univalentes. D) metafase con numerosos nucleolitos.	173
Figura 17: Híbridos del Género <i>Zea</i> con $2n=30$: A) <i>Z. mays</i> x <i>Z. perennis</i> ; B) <i>Z. parviglumis</i> x <i>Z. perennis</i>	174
Figura 18: A) Espiga de maíz, B) Cariopses de <i>Z. perennis</i> ; C) F1 de <i>Z. mays</i> x <i>Z. perennis</i> con $2n=30$; D) F1 de <i>Z. mays</i> por <i>Z. perennis</i> con $2n=40$	174
Figura 19: Clorantia en F1 de <i>Z. mays</i> x <i>Z. perennis</i> con $2n=30$...	175
Figura 20: Configuraciones meióticas observadas en diacinesis metafase I en: A) <i>Z. mays</i> con $2n=20$ (10II); B) <i>Z. perennis</i> (51V+10II); C) <i>Z. mays</i> x <i>Z. perennis</i> con $2n=30$ (5III+5II+5I); D) <i>Z. mays</i> x <i>Z. perennis</i> con $2n=40$ (5IV+10II).....	175
Figura 21: Híbrido de <i>Zea diploperennis</i> x <i>Zea perennis</i> con $2n=40$: A) cromosomas mitóticos; B) 10II+5IV.....	176
Figura 22: Híbrido entre <i>Zea parviglumis</i> x <i>Zea diploperennis</i> con $2n=40$	176
Figura 23: Configuraciones meióticas del híbrido entre <i>Z. parviglumis</i> x <i>Z. diploperennis</i> con $2n=40$: a)10II+5IV, b) 12II+4IV, c) anafase normal, d) anafase con cromosomas retrasados, e y f) células en distintos estadios de división meiótica permaneciendo unidas por los citoplasmas.....	177

Figura 24: Especies e híbridos de <i>Zea</i> : A) espigas de <i>Z. mays</i> ; <i>Z. diploperennis</i> y su híbrido, B) Inflorescencias femeninas del híbrido <i>Z. mays</i> x <i>Z. diploperennis</i> , <i>Z. luxurians</i> y el trihíbrido MDL (<i>Z. mays</i> x <i>Z. diploperennis</i>) x <i>Z. luxurians</i>	178
Figura 25: Trihíbrido MDP [(<i>Z. mays</i> x <i>Z. diploperennis</i>) x <i>Z. luxurians</i>]: A) plantas con clorantia en la panoja; B) panoja con clorantia, C) panoja con plántulas emitiendo raíces, D) plántulas de la panoja con igual genotipo que la planta madre.....	179
Figura 26: Configuraciones meióticas del trihíbrido MDL, [(<i>Z. mays</i> x <i>Z. diploperennis</i>) x <i>Z. luxurians</i>]: A) 10 II, tres de los bivalentes con diferente tamaño; B) 8II+1IV; C) cromosomas con asociación secundaria; D) célula con el número cromosómico duplicado; E) anafase I con puente de inversión; F) anafase con cromosomas retrasados.....	180
Figura 27: Porcentaje de tetravalentes por células observados en especies parentales con 2n=20 tratadas con solución diluida de colchicina ($0,5 \times 10^{-4}M$) y el testigo sin tratar.....	181
Figura 28: Porcentaje de cuadrivalentes por células observados en híbridos de <i>Zea</i> con 2n=20 tratadas con solución diluida de colchicina ($0,5 \times 10^{-4}M$) y el testigo sin tratar.....	182
Figura 29: Porcentaje de trivalentes por células observados en híbridos de <i>Zea</i> con 2n=30 tratadas con solución diluida de colchicina ($0,5 \times 10^{-4}M$) y el testigo sin tratar.....	183

Figura 30: Porcentaje de tetravalentes por células observados en especies parentales e híbridos de <i>Zea</i> con $2n=40$ tratados con solución diluida de colchicina ($0,5 \times 10^{-4}M$) y el testigo sin tratar.....	184
Figura 31: Configuraciones meióticas inducidas por el tratamiento con colchicina en: A) <i>Z. mays</i> con $2n=20$ (5IV); B) <i>Zea perennis</i> (81V + 4II); C) <i>Z. mays</i> x <i>Zea perennis</i> con $2n=30$ (10III); D) <i>Z. mays</i> x <i>Zea perennis</i> con $2n=40$ (9IV + 2II).	185
Figura 32: Configuraciones meióticas del trihíbrido <i>Zea mays</i> , <i>Zea diploperennis</i> y <i>Zea perennis</i> : A) Diacinesis con 5IV+10II; B) Diacinesis tratada con colchicina con 8IV+4II; C) Anafase I normal; D) Anafase I con puentes de inversión.....	186
Figura 33: Posible mecanismo de diferenciación de los cromosomas de <i>Zea</i> . Primera diferenciación: Especie poliploide con genomio A se habría diferenciado en los genomios A y B. Segunda diferenciación: Fundamentalmente los genomios B habrían mutado o diferenciado entre si para dar lugar a las diferentes especies de <i>Zea</i> con $2n=20$. En el caso de <i>Zea perennis</i> los cromosomas del genomio B a su vez habrían sufrido otra diferenciación dando lugar a los cromosomas homeólogos Bp1 y Bp2.	187

ABREVIATURAS

A	genomio A
Ab-10	<i>abnormal chromosome 10</i>
adh1	gen <i>alcohol dehydrogenase 1</i>
atm	atmósfera
B	cromosoma extra del complemento B
Bp₁	genomio homeólogo de <i>Zea perennis</i>
Bp₂	genomio homeólogo de <i>Zea perennis</i>
°C	grado centígrado
c1	gen <i>colored aleurone</i>
CaCl₂·2H₂O	cloruro de calcio bihidratado
cc	centímetro cúbico
cm	centrímetro
cDNA	ácido dexosirribonucleico complementario
DDP	días después de la polinización
DNA	ácido dexosirribonucleico
DNAr	ácido dexosirribonucleico ribosómico
d8	gen <i>dwarf 8</i>
FeSO₄·7H₂O	Sulfato de hierro con siete moléculas de agua
gr	gramo
I	cromosoma univalente
II	cromosoma bivalente
III	cromosoma trivalente
IK	ioduro de potasio
IV	cromosoma tetravalente
id1	gen <i>indeterminate growth 1</i>
F1	Primera generación producida por el cruzamiento de dos líneas parentales (homocigotos) o dos especies.
FE	frecuencia de embriogénesis somática
h	horas

H₃B₀₃	ácido bórico
ij	gen <i>iojap striping</i>
Kb	abreviatura para 1.000 pares de bases en el DNA o 1.000 bases en el RNA
KH₂PO₄	fosfato diácido de potasio
KNO₃	nitrato de potasio
L	brazo largo de un cromosoma
m	metro
M	molaridad
mg/l	miligramo por litro
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MDL	Trihíbrido entre <i>Zea mays</i> , <i>Zea diploperennis</i> y <i>Zea luxurians</i>
MDP	Trihíbrido entre <i>Zea mays</i> , <i>Zea diploperennis</i> y <i>Zea perennis</i> .
MgSO₄ 7H₂O	sulfato de magnesio heptahidratado (Sal de Epsom)
MnSO₄ H₂O	sulfato de manganeso monohidratado
N	normalidad
Na₂EDTA	EDTA de sodio
(NH₄)₂NO₃	nitrato diamónico
N103A	línea de maíz
N104B	línea de maíz
N107B	línea de maíz
N107C	línea de maíz
NIPs	<i>nearly identical paralogs</i>
O.N.	organizador del nucleolo
pb	pares de bases
pH	medida común de la acidez de una solución

Ph1	gen <i>pith abscission</i>
PI	gen <i>purple plant</i>
QTL	<i>quantitative trait loci</i>
R-r	gen <i>red colour</i>
RNAr	ácido ribonucleico ribosómico
RNAs	ácido ribonucleico de silenciamiento
rp1	gen <i>resistence Puccinia sorghi</i>
S	brazo corto de un cromosoma
Sn 1 N6	solución madre de macronutrientes
Sn2 N6	solución madre de micronutrientes
Sn Ca N6	solución madre de macronutrientes con calcio
Sn Fe-EDTA	solución madre de micronutrientes con hierro
ssp	subespecie
te1	gen <i>terminal ear 1</i>
tb1	gen <i>teosinte branched 1</i>
tga1	gen <i>teosinte glume architecture 1</i>
TIRs	<i>terminal inversion repetead</i>
TR-1	región de los <i>knobs</i> de 350 pares de bases
ts2	gen <i>tassel seed 2</i>
v22	gen <i>virescent</i>
X	número básico de una especie
zagl1	gen <i>zea agamous like 1</i>
zap1	gen <i>zea apetala homologous 1</i>
Zd	<i>Zea diploperennis</i>
ZdxZl:	híbrido entre <i>Zea diploperennis</i> x <i>Zea luxurians</i>
ZdxZp30	híbrido entre <i>Zea diploperennis</i> x <i>Zea perennis</i> con 2n=30
ZdxZp40:	híbrido entre <i>Zea diploperennis</i> x <i>Zea perennis</i> con 2n=40
zen1	gen <i>zea centroradiales 1</i>

zfl2	gen <i>zea floricaula leary 2</i>
ZI	<i>Zea luxurians</i>
ZlxZp	híbrido entre <i>Zea luxurians</i> x <i>Zea perennis</i>
Zm20	<i>Zea mays</i> con $2n=20$
Zm40	<i>Zea mays</i> con $2n=40$
ZmxZd20	híbrido entre <i>Zea mays</i> x <i>Zea diploperennis</i> con $2n=20$
ZmxZI	híbrido entre <i>Zea mays</i> x <i>Zea luxurians</i>
ZmxZm30	híbrido entre maíces de distinto nivel de ploidía
ZmxZmex	híbrido entre <i>Zea mays</i> x <i>Zea mexicana</i>
ZmxZp30	híbrido entre <i>Zea mays</i> x <i>Zea perennis</i> con $2n=30$
ZmxZp40	híbrido entre <i>Zea mays</i> x <i>Zea perennis</i> con $2n=40$
ZmxZpar20	híbrido entre <i>Zea mays</i> por <i>Zea parviglumis</i> con $2n=20$
ZmxZpar30	híbrido entre <i>Zea mays</i> x <i>Zea parviglumis</i> con $2n=30$
Zmex	<i>Zea mexicana</i>
ZnSO₄ 7H₂O	Sulfato de cinc heptahidratado
Zp	<i>Zea perennis</i>
ZpxZmex	híbrido entre <i>Zea perennis</i> x <i>Zea mexicana</i>
Zpar	<i>Zea parviglumis</i>
ZparxZd40	híbrido entre <i>Zea parviglumis</i> x <i>Zea diploperennis</i> con $2n=40$
WMT	línea de maíz
y1	gen <i>yellow 1</i>
2,4-D	2,4-diclorofenoxiacético
90-2189	línea de maíz



RESUMENES Y ABSTRACT

Resumen

El género *Zea* comprende varias especies de gramíneas de origen americano, de las cuales la única que tiene valor económico es *Zea mays* ssp *mays*, conocida como maíz, un cereal de alto valor energético cultivado para el consumo humano y animal.

Las especies silvestres, conocidas comúnmente como teosintes, difieren significativamente en su aspecto fenotípico con respecto al maíz, aunque en algunos casos han desarrollado un aspecto similar como repuesta a la erradicación selectiva realizada por los granjeros que las consideran como malezas del cultivo de maíz.

Con el fin de dilucidar las relaciones filogenéticas, el nivel de ploidía y la diferenciación en la evolución de los genomios homeólogos del género *Zea*, se analizaron especies e híbridos de *Zea* a nivel fenotípico, genotípico y citogenético, induciéndose con solución diluida de colchicina el apareamiento intergenómico críptico de los genomios homeólogos. Como resultado de este estudio se dedujo lo siguiente:

- La longitudes relativas de los cromosomas de las especies de *Zea* con $2n=20$ no difieren significativamente entre sí, presentando sólo pequeñas diferencias de tamaño en algunas especies. En la mayoría de los híbridos estas diferencias se minimizan, ya que los cromosomas homeólogos se aparean en su totalidad, no mostrando diferencias significativas. Estos resultados indicarían que en los cromosomas homeólogos de los híbridos del género *Zea*, las zonas intercromoméricas tenderían a acortarse o alargarse para que se produzca el apareamiento cromomérico. Las excepciones fueron el dihíbrido *Zea mays* x *Zea parviglumis* y el trihíbrido *Zea mays* x *Zea diploperennis* x

Zea luxurians, donde se aparearon tres pares de cromosomas homeólogos de distinto tamaño.

- En el caso de *Zea perennis* ($2n=40$), el tamaño de los cromosomas parece diferente al del resto de las especies con $2n=20$, pero si agrupan los cinco pares cromosómicos que tienen la misma forma y tamaño (1-2, 3-4, 7-8, 9-10 y 15-16) y se los considera como uno solo, sus cromosomas no difieren significativamente del resto del complejo *Zea*.
- La diferencia más notable entre los cromosomas del maíz y las especies silvestres es la posición de los *knobs*: mientras que el maíz carece de *knobs*, o son intersticiales, en las especies silvestres los *knobs* son terminales, pudiendo ser pequeños, medianos o grandes.

Del análisis de las configuraciones meióticas de las especies e híbridos de *Zea*, agrupadas de acuerdo a su nivel de ploidía, se infirió lo siguiente:

- Las especies e híbridos con un mismo nivel de ploidía tenían configuraciones meióticas, número de quiasmas, fertilidad del polen y viabilidad de las semillas similares. Las excepciones fueron *Z. mays* x *Z. mays* con $2n=30$, *Z. mays* con $2n=40$ y *Z. parviglumis* x *Z. diploperennis* con $2n=40$ que tenían configuraciones meióticas significativamente distintas del grupo al que pertenecen.
- Entre las especies con $2n=20$, *Zea mays* y *Zea mexicana* fueron las más estables cromosómicamente y las que tenían mayor fertilidad.
- Los híbridos entre las distintas especies de *Zea* con $2n=20$ fueron fértiles, siendo muy difícil de diferenciar, tanto a nivel fenotípico como cromosómico, de los teosintes.

- Solamente en el dihíbrido entre *Z. mays* x *Z. parviglumis* con $2n=20$ y en el trihíbrido entre *Zea mays* x *Zea diploperennis* x *Zea luxurians* se observó con muy baja frecuencia un tetravalente, producto del apareamiento entre dos pares de cromosomas homeólogos.
- El trihíbrido (*Zea mays* x *Zea diploperennis* x *Zea luxurians* con $2n=20$, tuvo menor fertilidad del polen (60-80%) y de la semilla (72%) que los dihíbridos con el mismo nivel de plodía.
- En los híbridos con $2n=30$, la configuración meiótica más frecuente fue $5III+5II+5I$, con un promedio de $5,46I+5,45II+4,50III$. La excepción en este grupo fue el híbrido intraespecífico *Z. mays* x *Z. mays* ($2n=30$), obtenido por cruzamiento entre los maíces con distinto nivel de ploidía ($2n=20$ y $2n=40$, respectivamente), siendo probable que la homología cromosómica y el apareamiento subsiguiente sean las causas del elevado número de trivalentes. La configuración meiótica más frecuente es de $2I+2II+8III$, con un promedio de $2,65I+2,56II+7,41III$.
- La fertilidad del polen osciló entre el 4% y el 83%, siendo inferior la fertilidad de la semilla (0-15%). Curiosamente, el híbrido más estéril y el más difícil de obtener fue el derivado del cruzamiento entre los maíces con distinto nivel de ploidía.
- En el grupo de las especies e híbridos con $2n=40$ se presentaron distintas situaciones. Por un lado, en *Zea mays* con $2n=40$ se observó un elevado porcentaje de tetravalentes (8,34) y un bajo porcentaje de bivalentes (3,24), quizá debido al apareamiento de los cromosomas homólogos de ambos genomios. En el otro extremo se hallaba el híbrido excepcional *Z. parviglumis* x *Z. diploperennis* con $2n=40$, producto de la duplicación cromosómica del híbrido entre ambas especies con $2n=20$, en el

que es posible que se apareen preferentemente los cromosomas homólogos de cada una de las especies, produciéndose como consecuencia un alto porcentaje de bivalentes (15,27) y un bajo porcentaje de tetravalentes (2,02). Por otro lado, *Zea perennis* y el resto de los híbridos con $2n=40$ tenían configuraciones meióticas similares con un promedio de apareamiento de 11,21II y 4,43IV.

El apareamiento críptico de los cromosomas homeólogos del género *Zea*, inducido con solución diluida de colchicina, fue diferente según el nivel de ploidía:

- En las especies e híbridos con $2n=20$ se aparearon los cromosomas homeólogos de ambos genomas, obteniéndose hasta un máximo de 5IV. La excepción fue *Zea diploperennis* y los híbridos con esta especie, en donde no se indujo el apareamiento críptico de los cromosomas homeólogos, al menos con la dosis de colchicina empleada.
- En los híbridos con $2n=30$ aumentó el apareamiento críptico de los cromosomas homeólogos hasta un máximo de 10III, siendo la excepción el híbrido entre *Z. mays* x *Z. mays* con $2n=30$ donde no se observaron diferencias significativas entre el material tratado con respecto al no tratado.
- En especies e híbridos con $2n=40$ se produjo un apareamiento críptico de los cromosomas homeólogos hasta un máximo de 10IV, a excepción de *Z. mays* con $2n=40$, donde prácticamente no hubo diferencias significativas entre el material tratado y sin tratar.

Integrando los resultados de otros autores con los obtenidos en el presente trabajo, se podría inferir que el mecanismo evolutivo del género *Zea* habría sido el siguiente (Fig. 33):

1. A partir de un ancestro común poliploide con genomio AAAA se habrían diferenciado los cromosomas homólogos dando lugar a una especie diploide con dos genomios A y B. Esta nueva especie habría tenido mayor ventaja adaptativa al ser más estable por comportarse como un diploide funcional.
2. En el siguiente paso evolutivo se habría diferenciado el genomio B, dando lugar a la aparición de las distintas especies de *Zea*.
3. Las especies habrían mantenido su capacidad de hibridarse hasta la actualidad, dando descendencia fértil al no haberse producido cambios dramáticos en los cromosomas homeólogos.
4. Esta diferenciación evolutiva, sin grandes alteraciones a nivel cromosómico, posiblemente se haya visto favorecida por el aislamiento geográfico que mantuvieron las especies.

Resum

El gènere *Zea* comprèn diverses espècies de gramínies d'origen americà, de les quals l'única que té valor econòmic és *Zea mays* ssp. *mays*, coneguda com a dacsa, un cereal d'alt valor energètic conreat per al consum humà i animal.

Les espècies silvestres, conegudes col·lectivament com a teosintes, difereixen significativament en l'aspecte fenotípic pel que fa a la dacsa, encara que en alguns casos han desenvolupat un aspecte similar, com a resposta a l'eradicació selectiva duta a terme pels grangers, que la consideren una mala herba del cultiu de dacsa.

Amb la finalitat de dilucidar les relacions filogenètiques, el nivell de ploïdia i la diferenciació en l'evolució dels genòmics homeòlegs del gènere *Zea*, s'han analitzat espècies i híbrids de *Zea* en el pla fenotípic, genotípic i citogenètic, i s'ha induït amb solució diluïda de colquicina l'apariament intergenòmic críptic dels genòmics homeòlegs.

Com a resultat d'aquest estudi, es dedueix el següent:

- La longituds relatives dels cromosomes de les espècies de *Zea* amb $2n=20$ no difereixen significativament entre si, i presenten només petites diferències de grandària en algunes espècies. En la majoria dels híbrids aquestes diferències es minimitzen, ja que els cromosomes homeòlegs s'aparien íntegrament i no mostren diferències significatives. Aquests resultats indicarien que en els cromosomes homeòlegs dels híbrids del gènere *Zea*, les zones intercromomèriques tendrien a escurçar-se o allargar-se perquè es produïra l'apariament cromomèric. Les excepcions han sigut el dihíbrid *Zea mays* x *Zea parviglumis* i el trihíbrid *Zea*

mays x *Zea diploperennis* x *Zea luxurians*, en què s'han aparejat tres parells de cromosomes homeòlegs de dimensions diferents.

- En el cas de *Zea perennis* ($2n=40$), les dimensions dels cromosomes semblen diferents de les de la resta de les espècies amb $2n=20$, però si s'agrupen els cinc parells cromosòmics que tenen la mateixa forma i grandària (1-2, 3-4, 7-8, 9-10 i 15-16) i se'ls considera com un de sol, els seus cromosomes no difereixen significativament de la resta del complex *Zea*.
- La diferència més notable entre els cromosomes de la dacsa i les espècies silvestres ha sigut la posició dels *knobs*: mentre que la dacsa no tenia *knobs* o presentava *knobs* de tipus intersticial, en les espècies silvestres els *knobs* eren terminals, i podien ser petits, mitjans o grans.

De l'anàlisi de les configuracions meiótiques de les espècies i híbrids de *Zea*, agrupades d'acord amb el seu nivell de ploïdia, s'infereix el següent:

- Les espècies i híbrids amb un mateix nivell de ploïdia tenen similars configuracions meiótiques i nombre de quiasmes, fertilitat del pol·len i viabilitat de les llavors. Les excepcions han sigut *Z. mays* x *Z. mays* amb $2n=30$, *Z. mays* amb $2n=40$ i *Z. parviglumis* x *Z. diploperennis* amb $2n=40$, que tenen configuracions meiótiques significativament diferents del grup a què pertanyen.
- Entre les espècies amb $2n=20$, *Zea mays* i *Zea mexicana* han sigut les més estables cromosòmicament i les que tenen més fertilitat.

- Els híbrids entre les diferents espècies de *Zea* amb $2n=20$ han sigut fèrtils, i són molt difícil de diferenciar, tant en el pla fenotípic com en el cromosòmic, dels teosintes.
- Solament en el dihíbrid entre *Z. mays* x *Z. parviglumis* amb $2n=20$ i en el trihíbrid entre *Zea mays* x *Zea diploperennis* x *Zea luxurians*, s'ha observat amb molt baixa freqüència un tetravalent, producte de l'apariament entre dos parells de cromosomes homeòlegs.
- El trihíbrid (*Zea mays* x *Zea diploperennis* x *Zea luxurians* amb $2n=20$) ha tingut menor fertilitat del pol·len (60-80%) i de la llavor (72%) que els dihíbrids amb el mateix nivell de ploïdia.
- En els híbrids amb $2n=30$, la configuració meiòtica més freqüent ha sigut 5III+5II+5I, amb una mitjana de 5,46I+5,45II+4,50III. L'excepció en aquest grup ha sigut l'híbrid intraespecífic *Z. mays* x *Z. mays* ($2n=30$), obtingut per encreuament entre les daces amb diferent nivell de ploïdia ($2n=20$ i $2n=40$, respectivament), en què és probable que l'homologia cromosòmica i l'apariament subsegüent siguin les causes de l'elevat nombre de trivalents, i la configuració meiòtica més freqüent és 2I+2II+8III, amb una mitjana de 2,65I+2,56II+7,41III.
- La fertilitat del pol·len ha oscil·lat entre el 4% i el 83%, sent inferior la fertilitat de la llavor (0-15%). Curiosament, l'híbrid més estèril i el més difícil d'obtenir ha sigut el derivat de l'encreuament entre les daces amb diferent nivell de ploïdia.
- En el grup de les espècies i híbrids amb $2n=40$ s'han presentat diverses situacions. D'una banda, en *Zea mays* amb $2n=40$ s'ha observat un percentatge de tetravalents elevat (8,34) i un percentatge de bivalents baix (3,24), potser a causa de l'apariament dels cromosomes homòlegs de tots dos genomes.

En l'altre extrem es troba l'híbrid excepcional *Z. parviglumis* x *Z. diploperennis* amb $2n=40$, producte de la duplicació cromosòmica de l'híbrid entre les dues espècies amb $2n=20$, en el qual és possible que s'aparien preferentment els cromosomes homòlegs de cadascuna de les espècies, i així es produeix com a conseqüència un percentatge de bivalents alt (15,27) i un percentatge de tetravalents baix (2,02). D'altra banda, *Zea perennis* i la resta dels híbrids amb $2n=40$ tenien configuracions meiòtiques similars, amb una mitjana d'apariament d'11,21II i 4,43IV.

L'apariament críptic dels cromosomes homeòlegs del gènere *Zea*, induït amb solució diluïda de colquicina, ha variat segons el nivell de ploïdia:

- En les espècies i els híbrids amb $2n=20$ s'han apariat els cromosomes homeòlegs de tots dos genomes, i s'ha obtingut fins a un màxim de 5IV. L'excepció ha sigut *Zea diploperennis* i els híbrids amb aquesta espècie, on no s'ha induït l'apariament críptic dels cromosomes homeòlegs, almenys amb la dosi de colquicina emprada.
- En els híbrids amb $2n=30$ ha augmentat l'apariament críptic dels cromosomes homeòlegs fins a un màxim de 10III, i l'excepció ha sigut l'híbrid entre *Z. mays* x *Z. mays* amb $2n=30$, on no s'han observat diferències significatives entre el material tractat pel que fa al no tractat.
- En espècies i híbrids amb $2n=40$ es produeix apariament críptic dels cromosomes homeòlegs fins a un màxim de 10IV, llevat de *Z. mays* amb $2n=40$, on pràcticament no hi ha diferències significatives entre el material tractat i sense tractar.

Integrant els resultats d'altres autors amb els obtinguts en aquest treball, es podria inferir que el mecanisme evolutiu del gènere *Zea* hauria sigut el següent (fig. 33):

1. A partir d'un ancestre comú poliploide amb genoma AAAA, s'haurien diferenciat els cromosomes homòlegs i haurien donat lloc a una espècie diploide amb dos genomes A i B. Aquesta nova espècie hauria tingut major avantatge adaptatiu, ja que és més estable perquè és diploide.
2. En el següent pas evolutiu s'hauria diferenciat el genoma B i hauria donat lloc a l'aparició de les diferents espècies de *Zea*.
3. Les espècies haurien mantingut la capacitat d'hibridar-se fins a l'actualitat, i això donaria descendència fèrtil pel fet de no haver-se produït canvis dramàtics en els cromosomes homeòlegs.
4. Possiblement, aquesta diferenciació evolutiva sense grans alteracions en el pla cromosòmic s'ha vist afavorida per l'aïllament geogràfic que han mantingut les espècies.

Abstract

The *Zea* Genus includes various species of gramineae of American origin. Of all those species, the only one which has economical value is *Zea mays* ssp *mays*, known as maize, a cereal of high energy value which is cultivated for human and animal consumption.

Wild species, known as teosinte, differ significantly in phenotype with respect to maize, although in some cases, have developed a similar appearance, as response to the selective eradication by farmers who consider it a weed of cultivation of maize.

In order to elucidate the philogenetic relations, ploidy and differentiation in the evolution of the *Zea* Genus homeologous genomes, *Zea* species and hybrids were analysed from the phenotypical, genotypical and cytogenetical point of view, inducing the cryptic intergenomic pairing of the homeologous genomes with a diluted solution of colchicine.

As a result of this study it has been observed that:

The relative chromosome length of the *Zea* species with $2n=20$ does not differ significantly from one to another, showing only small differences of size in some species. In most of the hybrids these small differences were minimized since all of the homeologous chromosomes paired and showed very small differences. These results seem to show that, in the homeologous chromosomes of *Zea* Genus hybrids, the interchromomeric areas get shorter or longer in order to allow chromomeric pairing. The exceptions were the *Zea mays* x *Zea parviglumis* dihybrid and the *Zea mays*, *Zea diploperennis* and *Zea luxurians* trihybrid, where three pairs of homeologous chromosomes of different sizes paired.

In the case of *Zea perennis* ($2n=40$), the size of the chromosomes is apparently different to the rest of the species with $2n=20$, but if they are grouped and the five chromosome pairs that have the same form and size (1-2, 3-4, 7-8, 9-10 and 15-16) are considered as only one, its chromosomes do not significantly differ from the rest of the *Zea* complex.

The most considerable difference among the maize and wild species chromosomes was the position of the knobs. While in the maize there were no knobs or they were interstitial, in the wild species they were terminal and could be small, medium or large.

From the analysis of the meiotic configurations of the *Zea* species and hybrids, grouped according to their ploidy, it was inferred that:

- The species and hybrids bearing the same ploidy had similar meiotic configurations, number of chiasmata, pollen and seed fertility. The exceptions were *Z. mays* with $2n=40$ and the hybrids *Z. mays* x *Z. mays* with $2n=30$ and *Z. parviglumis* x *Z. diploperennis* with $2n=40$, which significantly varied their meiotic configurations from the group they belonged to.
- Among the species with $2n=20$, *Zea mays* and *Zea mexicana* had the most chromosome stability and were the most fertile.
- The hybrids between the different *Zea* species with $2n=20$ were fertile and it was difficult to differentiate them from the teosinte in their phenotypical aspect and chromosomes.
- A tetravalent, produced by the pairing of two pairs of homeologous chromosomes was occasionally observed only in the dihybrid between *Z. mays* x *Z. parviglumis* with $2n=20$ and

the trihybrid in the *Zea mays*, *Zea diploperennis* and *Zea luxurians*

- The trihybrid with $2n=20$ had less pollen (60-80%) and seed (72%) fertility than the dihybrids bearing the same ploidy.
- In the hybrids with $2n=30$, the most frequent meiotic configuration was $5III+5II+5I$, with an average of $5.46I+5.45II+4.50III$. The exception in this group was the hybrid between the maize with different ploidy (*Z. mays* x *Z. mays* $2n=30$), where, since the chromosomes were homeologous, there exists a probability that they paired among themselves, and therefore produced a high number of trivalent, and the most frequent meiotic configuration being $2I+2II+8III$, with an average of $2.65I+2.56II+7.41III$.
- Pollen fertility varied between 4 and 83% whereas seed fertility was lower (0-15%). Strangely, the hybrid between maize of different ploidy was the most sterile and the most difficult to obtain.

In the group including the species and hybrids with $2n=40$, a number of different situations were found:

- *Zea mays* with $2n=40$ had a high percentage of tetravalent (8.34) and a low percentage of bivalent (3.24), possibly due to the pairing of the homologous chromosomes of both genomes. At the other extreme, was the exceptional hybrid produced by the chromosomal duplication between *Z. parviglumis* x *Z. diploperennis* with $2n=40$, which gave rise to *Z. parviglumis* x *Z. diploperennis* with $2n=40$, where it is possible for the homeologous chromosomes of each of the species to preferentially paired, and consequently, a high percentage of bivalents (15.27) and a low percentage of

tetravalent (2.02) are produced. *Zea perennis* and the rest of the hybrids with $2n=40$ had similar meiotic configurations with a pairing average of 11.21II and 4.431V.

The cryptic pairing of *Zea mays* homeologous chromosomes, induced with diluted colchicine solution, varied according to the ploidy:

- In species and hybrids with $2n=20$, homeologous chromosomes of both genomes pairing, obtaining a maximum of up to 5IV. The exception was *Zea diploperennis* and the hybrids with this species, where the cryptic pairing of homeologous chromosomes was not induced at least with the dose of colchicine, in which all of the *Zea* species responded favorably.
- In the hybrids with $2n=30$, the cryptic pairing of homologous chromosomes increase to a maximum of 10III, with the exception of the hybrid between *Z. mays* x *Z. mays* with $2n=30$, where significant differences between the treated and non-treated material were not observed. It seems that in this hybrid, preferential pairing of homologous chromosomes took place and as a result, cryptic pairing of homologous chromosomes was not induced.
- In species and hybrids with $2n=40$, cryptic pairing of homeologous chromosomes took place up to a maximum of 10IV, with the exception of *Z. mays* with $2n=40$, where significant differences between treated and non-treated material did not exist.

By integrating results obtained by other authors with our own, it can be deduced that the evolutionary mechanism of the *Zea* Genus could have been the following:

1. Starting from a common polyploid ancestor with AAAA genome, the homologous chromosomes seem to have been differentiated giving rise to a diploid species with two genomes A and B. This new species seems to have had more advantages to adapt since it is more stable due to the fact that it is diploid
2. In the next evolutionary stage, the B genome seems to have been differentiated giving rise to the different *Zea* species.
3. The species that have appeared until today seem to have maintained their ability to hybridize, giving rise to fertile descendants due to the fact that no dramatic changes occurred in the homeologous chromosomes.
4. This evolutionary differentiation without great chromosomal alterations was possibly favored since the species kept themselves geographically isolated.

INTRODUCCIÓN



1 Clasificación Científica del Género *Zea*

El género *Zea* comprende varias especies de gramíneas de origen americano, de las cuales la única que cuenta con valor económico es *Zea mays* ssp *mays*, conocida como maíz, un cereal de alto valor energético cultivado para el consumo humano y animal.

Las especies silvestres del género *Zea*, conocidas colectivamente como Teosintes, difieren significativamente en su aspecto fenotípico con respecto al maíz, aunque en algunos casos, han desarrollado un aspecto similar, como repuesta a la erradicación selectiva realizada por los granjeros que la consideran una maleza del cultivo de maíz.

El género *Zea* pertenece al:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Tribu: Maydeas

Género: *Zea*

El género *Zea* se subdivide a su vez en las secciones Luxuriante y *Zea* (Doebley, 1990):

La **Sección Luxuriante** incluye:

Especies perennes: *Zea perennis* (Hitchcock) Reeves y Mangelsdorf

Zea diploperennis (Iltis, Doebley y Guzmán)

Especies anuales: *Zea luxurians* (Durie y Ascherson) Bird

Zea nicaraguensis (Iltis y Benz)

La **Sección Zea** comprende una sola especie anual *Zea mays* L. Dobley e Iltis (1980) e Iltis y Dobley (1980), con tres subespecies y variedades dentro de ellas.

La **Sección Zea** abarca:

Especie	Subespecie	Variedad
<i>Zea mays</i> L.	<i>Zea mays</i> ssp. <i>mays</i>	americana (Mill)
		canina (Watson)
		crystosperma (Bonaf.)
		erythrolepis (Bonaf.)
		gigantea (Bonf.) Hort y Vilm
		glumacea (Larrañaga)
		hirta (Bonaf.)
		macrosperma (Klotzsch)
		rostrata (Bonaf.)
		saccharata (Sturtev.)
		segetalis (Salisb.)
		tunicata (Larrañaga) Sturtev.
		vulgaris (Mill.)
<i>Zea mays</i> ssp. <i>parviglumis</i>	<i>Zea mays</i> ssp. <i>parviglumis</i>	parviglumis (Iltis y Doebley)
		huehuetenangensis (Iltis y Doeb.)
<i>Zea mays</i> ssp. <i>mexicana</i>	<i>Zea mays</i> ssp. <i>mexicana</i>	nobogame (Schrader) Iltis
		chalco (Schrader) Iltis
		plateau central (Schrader) Iltis

Todos los taxones mencionados tienen un número cromosómico de $2n=20$ con excepción de *Zea perennis* que tiene $2n=40$.

2 Número básico de las Maydeas

La tribu Maydeae esta compuesta por siete géneros *Zea*, *Tripsacum*, *Coix*, *Trilobachne*, *Polytoca*, *Sclarchne* y *Chionachne* (Celarier, 1957a), con dos números básicos $x=5$ o 10 y $x=9$ compartido con muchos de los géneros de la tribu de las Andropogóneas (Bolkhvsjijh *et al.*, 1969; Celarier 1956, 1957a, b; Darlington y Wiley, 1956).

Stebbins (1982) propuso dos hipótesis con respecto al número básico actual de la familia de las Poáceas, puntualizando que las Andropogóneas y las Maydeas habrían llegado al número básico actual por reducción de $x=12$ o por poliploidía a partir de $x=5$ o múltiplo de 5 (10, 20, 40), con excepción de *Tripsacum* cuyo número básico es $x=9$, teniendo las distintas especies $2n=18, 36, 72$.

Para Celarier (1956) el número básico de las Andropogóneas y las Maydeas se habría originado exclusivamente por aloploidía a partir $x=5$, siendo el $x=9$ de origen secundario por pérdida de un cromosoma del aloploidio.

Según Stebbins (1982), el género *Coix* derivó de las Andropogóneas, siendo el único diploide de las Maydeas con $2n=10$. Situación similar presentan los géneros *Sorghum* y *Elyonurus* (Celarier, 1957 b).

3 Distribución geográfica

La distribución del teosinte en Méjico (Fig. 1) se extiende desde la porción sur conocida como Aridamérica en la Sierra Madre Occidental del estado de Chihuahua y Valle de Guadiana en Durango, hasta la frontera con Guatemala incluyendo prácticamente toda la porción occidental de Mesoamérica. En las diferentes regiones de Méjico

existen poblaciones de teosintes con características morfológicas y genéticas que permiten su diferenciación. La distribución geográfica de las distintas poblaciones de los teosintes no es uniforme, sino que hay condiciones específicas de clima, suelo e influencia humana que determinan su localización (Ruiz *et al.*, 2001).

Iltis y Benz (2000) hallaron en Nicaragua una nueva especie de teosinte denominada *Zea nicaraguensis*. En el resto del mundo sólo se las encuentra en los jardines botánicos o en centros de investigación que trabajan con dichas especies.

Debido a la mejora que ha realizado el ser humano la distribución geográfica del maíz es, en cambio, mucho más amplia y prácticamente se cultiva en todos los continentes (Gore *et al.*, 2009).

4 Características morfológicas

Maíz

Zea mays ssp. *mays* es una planta anual con una o dos cañas macizas, generalmente erguidas, con 8 o más nudos regularmente distribuidos. Las vainas son glabras o hirsutas con lígulas cortas. Las hojas son láminas planas y lanceoladas pudiendo ser glabras o pubescentes de 0,40 a 1 m de largo y de 4 a 10 cm. de ancho.

La panoja masculina es plurirrámea y apical. La espiga femenina tiene disposición axilar, estando recubierta por brácteas foliáceas (chala), conteniendo de 4 a 30 hileras de granos (hileras pares y solo excepcionalmente impares), teniendo las espiguillas sésiles dos flores aunque solo una de ellas es fértil.

El cariopse es cuneiforme, acuminado, comprimido o prismático, mide de 5 a 25 mm de largo, y generalmente sobresale de las glumas o glumelas, pudiendo tener endosperma amiláceo, dextrinoso o ceroso.

Teosintes

Teosinte en lengua indígena significa “el grano de los dioses”, siendo el nombre común de un grupo de especies anuales o perennes del género *Zea* nativas de Méjico y América Central.

Los Teosintes se caracterizan por tener dos a más tallos erguidos y robustos o varios tallos delgados, erectos o semirastreros. Las raíces están dispuestas en cabellera, con rizomas cortos de crecimiento definido.

La inflorescencia masculina es una panoja apical y plurirrúmea teniendo cada espiguilla dos flores, una fértil y la otra estéril. En algunos casos es semejante a la del maíz y en otros es diferente, porque en la misma panoja puede haber flores masculinas y femeninas, dando en la misma estructura floral tanto polen como granos.

Las espiguillas femeninas son dísticas teniendo dos flores introducidas en excavaciones alternas del raquis que se desarticulan cayéndose los granos a la madurez. Las espigas están envueltas por varias brácteas foliáceas, análogas a las del maíz y reunidas de dos o más en fascículos insertados en las axilas foliares. La gluma inferior es navicular, endurecida, lustrosa, abrazando a la gluma superior e incluyendo al grano.

Las flores están cubiertas por glumelas hialinas. La inferior es estéril, mientras que la superior tiene el ovario globoso con un estilo que puede medir 10-12 cm.

La diferencia fundamental entre el maíz y los Teosintes está en la espiga. Los Teosintes poseen de 5 a 12 granos por espiga (Fig.2B), llevando adherido el artejo del raquis que se desarticula y cae a la madurez. La dispersión la realizan fundamentalmente los pájaros y los mamíferos ya que las cápsulas que envuelven los granos hacen que sobrevivan al paso del tracto digestivo de los animales. El maíz, en cambio, tiene una espiga con 200 a 700 granos adheridos al marlo de la espiga (Fig. 2A). Los granos no tienen una adecuada protección destruyéndose cuando son comidos por los animales. La multiplicación del maíz es completamente dependiente del hombre ya que si cae una espiga germinan todos los granos juntos, compitiendo entre ellos por los nutrientes y la luz, lo que origina la muerte de casi todas las plantas por competencia entre ellas.

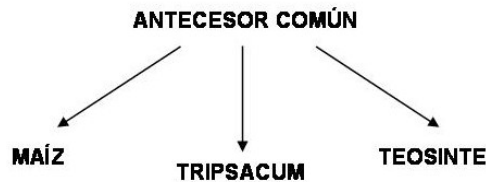
5 Origen del maíz

Si bien se conoce el origen americano del género *Zea*, no se ha podido aún establecer con exactitud su origen evolutivo, discutiéndose hasta la actualidad si proviene de un antecesor semejante al maíz que por selección de los indígenas ha derivado en el maíz moderno; si la espiga actual es una monstruosidad biológica que se originó por azar a través de un dramático cambio en el desarrollo; o si deriva del teosinte, habiéndose llegado al maíz moderno por selección durante varios cientos de años como parecen indicar los trabajos más recientes (Gore *et al.*, 2009).

Esta controversia puede resumirse en distintas teorías, con adeptos que han presentado numerosos trabajos apoyando o descartando a una u otra.

5.1 La teoría del antecesor común

En 1906, Montgomery propone que el maíz y otras especies silvestres relacionadas derivan de un antecesor común.



En 1918, Weatherwax enumera las características de ese antecesor común.

- Es una planta perenne
- Las flores femeninas y masculinas están separadas
- Las flores femeninas no tienen ramificaciones y sus entrenudos son cortos
- Los granos están protegidos individualmente por cápsulas

5.2 La teoría del anfiploide

Fue propuesta por Anderson en 1945. Este autor supone que los 20 cromosomas de maíz provienen del cruzamiento de dos especies, con 10 cromosomas cada una, siendo estos dos antecesores el Coix y el Sorgo. Esta teoría fue rápidamente descartada debido a que propone que el maíz se originó en el Sur de Europa, trasladándose por la glaciación hasta América, mientras que está documentado que el maíz fue llevado al viejo mundo por Cristóbal Colón. Lo novedoso de esta

teoría es que propone que el maíz tuvo dos orígenes, uno geográfico (Europa) y otro evolutivo (América).

5.3 La teoría del maíz papirescente

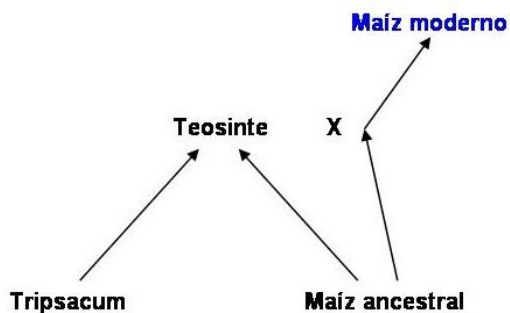
Data de 1950. En esta época el Ingeniero Andrés, descubre en Argentina un maíz de tipo papirescente (tunicata), cuyos granos están envueltos por glumas muy finas, sugiriendo que este tipo de maíz sería el ancestral (Andrés, 1950).

5.4 La teoría del maíz herbáceo

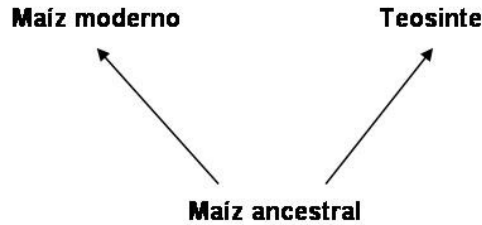
Singleton, en 1951, propone que el maíz moderno proviene de un antecesor herbáceo con tallos delgados. La teoría fue rápidamente descartada porque eran contradictorias estas conjeturas con los descubrimientos arqueológicos realizados en esa época.

5.5 La teoría tripartita

Mansgeldorf y Reeves proponen en 1940 la teoría tripartita, según la cual el maíz moderno deriva de un cruzamiento del teosinte con maíz y, a su vez, el teosinte se obtiene por hibridación entre maíz y *Tripsacum*

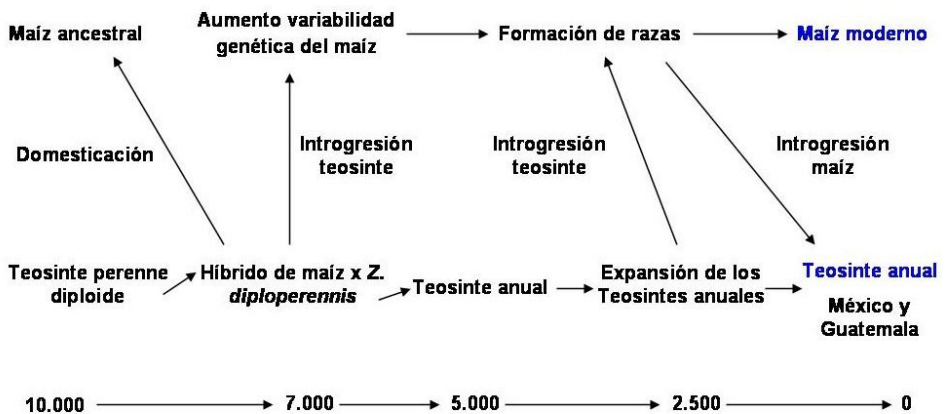


Posteriormente Mangelsdorf (1983) reelabora su teoría y propone que el maíz evolucionó a partir de otro maíz tipo pisingallo dando lugar al maíz moderno y a los teosintes



En 1979 se descubre en Jalisco (Méjico) una nueva especie de teosinte diploide y perenne denominada *Zea diploperennis*. Con su aparición Wilkes (1979), elabora una complicada teoría donde supone que el maíz y el teosinte perenne diploide existían en estado salvaje hace más de 10.000 años y por distintos cruzamientos e introgresiones entre el maíz primitivo y el teosinte se llega al maíz moderno y a los teosintes anuales.

En el diagrama se resume la elaborada teoría de Wilkes.



5.6 La teoría del Teosinte como antecesor del maíz

La mayoría de las especies cultivadas difieren de sus antecesores por algunas características que podrían calificarse como “discretas” (e.g., fruto grande *versus* pequeño; semilla grande *versus* pequeña; raquis quebradizo *versus* no quebradizo, etc.). En cambio, el maíz tiene diferencias morfológicas con los teosintes que podrían calificarse como “dramáticas”, ya que no sólo afectan a la arquitectura de la planta, sino también a la arquitectura de la inflorescencia femenina y de la mazorca, el número y tipo de granos, etc. (Iltis, 1981). La magnitud de estas diferencias explica las reticencias iniciales a considerar al teosinte como ancestro del maíz.

Los primeros en mencionar que el teosinte podría ser el antecesor del maíz fueron Ascherson, en 1875, y el botánico Vinson, en 1877. Los investigadores de esa época, se mostraron escépticos con esta teoría ya que les resultaba imposible pensar, que por simple selección humana, se llegase a obtener especies diametralmente opuestas. Refiriéndose a esto Kempton escribió en 1926, “la probabilidad de que el maíz se haya obtenido por selección a partir del teosinte es idéntica a la de que una máquina de escribir reproduzca las obras de Shakespeare”.

En 1888, Duges encontró en Méjico una planta intermedia entre el maíz y el teosinte, que no reconoció como híbrido entre ambas especies, a la que denominó *Zea canina* o “maíz de los coyotes” y a la que consideró como la planta antecesora del maíz.

En 1929, George Beadle (1932a-b, 1939) obtiene uno de los primeros híbridos entre maíz y teosinte. Del estudio citogenético que realiza llega a la conclusión de que los cromosomas de maíz y teosinte son

compatibles dando lugar a híbridos fértiles. Emerson y Beadle (1932) sugieren que son la misma especie, considerando al teosinte el antecesor directo del maíz.

Según Emerson (1929), sólo son necesarias dos mutaciones para obtener el maíz: una que suprima la fragilidad del raquis, lo que impide que se caigan los granos; y otra que modifique la característica de grano encapsulado por grano desnudo.

Entre 1940 y 1980 se establece un titánico debate entre Beadle y Mangelsdorf, dos de los más reconocidos biólogos del siglo pasado, donde cada uno aporta pruebas a favor de su teoría: Beadle considera al teosinte como antecesor del maíz y Mangelsdorf opina que el maíz moderno deriva de un maíz extinguido semejante al actual.

En 1970, Beadle siembra 50.000 plantas de la F2 procedente de un cruzamiento entre maíz por teosinte. Por cada 500 plantas de la F2 aparece una con la característica de los parentales, por lo cual supone que las dos especies solo se diferencian en 5 genes (Beadle 1977, 1978, 1980, 1981).

En 1979, Guzmán descubre en las Sierras de Majantlán (Méjico) un nuevo teosinte perenne con un número cromosómico de $2n=20$, denominado *Zea diploperennis* Iltis, Doebley y Guzmán (Iltis *et al.*, 1979). A partir de este descubrimiento se vuelve a considerar la teoría del origen tripartito del maíz, que postula que el teosinte anual proviene de una hibridación entre *Zea diploperennis* por un maíz extinguido y que el maíz proviene de sucesivas introgresiones con los parentales.

Eubank (1997) analizando fragmentos de restricción de híbridos de teosinte con *Tripsacum* encontró correlaciones intergenómicas entre ellos y las relacionó con las variaciones producidas en la arquitectura de la espiga. Posteriormente halló que las espigas de los descendientes del cruzamiento entre *Zea diploperennis* y *Tripsacum* eran morfológicamente muy similares a las de los maíces encontrados en yacimientos arqueológicos (Eubank, 2001). Como resultado de estos estudios propone la teoría de que una hibridación entre un teosinte y *Tripsacum* habría intervenido en la evolución del maíz. La teoría de Eubank no concuerda con las observaciones de Galinat (1974). Este último autor, analizando la distribución de los bloques de heterocromatina, denominados *Knobs*¹ en los cromosomas de maíz y *Tripsacum*, había llegado a la conclusión que el *Tripsacum* no intervino en la evolución del maíz.

McClintock *et al.* (1981); Kato (1976, 1982) y Molina (1883, 1985, 1986), comparando la morfología de los cromosomas de maíz y algunos teosintes en paquitenio, concluyen que son esencialmente similares en tamaño y relación entre los brazos, diferenciándose fundamentalmente en la distribución de los *knobs*: mientras que en el maíz los *knobs* son subtelo méricos, en los teosintes son principalmente teloméricos y solo excepcionalmente subtelo méricos, hallándose mayor número en los teosintes (34) que en el maíz (23).

¹Los *knobs* fueron descubiertos por McClintock en 1929, siendo utilizados desde un inicio como marcadores citogenéticos ya que son componentes de heterocromatina observados en paquitenio y característicos en cada una de las especies por tener posiciones fijas en los cromosomas (Neuffer *et al.*, 1997). En el maíz, el número, tamaño y posición es variable habiéndose hallado 23 posibles localizaciones en sus 10 cromosomas (McClintock *et al.*, 1981).

Kato (1982) analizó en poblaciones de maíz y teosinte una inversión del cromosoma 9, hallándola en maíces de Suramérica y en teosintes que no tenían relación alguna entre sí como son las poblaciones *Zea mexicana* Chalco, Nobogame y Guatemala. Como es poco probable que por azar se produzca la misma inversión en dos poblaciones no emparentadas, concluye que tiene que haberse transmitido a través de un antecesor común.

Beadle (1977, 1980, 1981) propone que el primer paso en la transformación del teosinte a maíz la habrían realizado los indígenas al recolectar teosintes más fáciles de cosechar porque sus granos no se caían a la madurez.

Iltis (1981), integrando resultados de trabajos de otros autores (Montgomery, 1906; Gay y Menetier, 1978) con los propios, propone que el teosinte es el antecesor del maíz y que la conversión de uno a otro en el proceso de la domesticación se produjo en un solo paso macroevolutivo. El cambio, habría consistido esencialmente en que las panojas situadas en las extremidades laterales del tallo se fusionaran para dar lugar a una espiga. A esta teoría la llamó "Teoría de la transmutación sexual catastrófica".

En cambio, para Galinat (1983) las diferentes etapas evolutivas por las que pasó la espiga de teosinte para convertirse en la de maíz son:

1. Originalmente, las espiguillas laterales bien desarrolladas portaban dos hileras de granos y una pequeña panoja en la parte superior, que se perdió.
2. Los entrenudos del tallo se acortaron.

3. Dos o más espiguillas comenzaron a fusionarse dando lugar a una espiga de 6 hileras. Como resultado de la mejora genética se obtuvieron los maíces modernos de hasta 34 hileras.

Doebley (2004), no estando de acuerdo con la teoría de la 'transmutación sexual catastrófica', propone que el proceso de transformación de la espiga de teosinte a maíz comprendió cuatro etapas:

1. La espiga del teosinte está formada por una cúpula que protege al grano. La cúpula está formada por una invaginación del raquis y una gluma modificada. En el maíz, por un proceso evolutivo, la cúpula y la gluma reducen su tamaño y se agrupan formando la espiga.
2. En la espiga del teosinte los granos se desarticulan y caen a la madurez, dispersándose como semillas individuales. En el maíz domesticado no se produce la abscisión de la cúpula y, como consecuencia, la espiga de maíz permanece intacta a la madurez sobreviviendo la especie sólo si el hombre la cultiva.
3. En el teosinte cada cúpula tiene una sola espiguilla. Evolutivamente debió existir primero un teosinte con dos espiguillas, abortando una de ellas para dar lugar al teosinte moderno. En cambio, en el maíz las dos espiguillas permanecieron fértiles.
4. En el teosinte, la cúpula fructífera tiene dos hileras en lados opuestos. En el maíz se han fusionado las mismas dando lugar a cúpulas con dos o cuatro hileras.

Con respecto a la herencia de los caracteres 'tipo de espiga' y 'número de espiguillas de las hileras' existe una serie de trabajos que llegan a conclusiones contradictorias. Por ejemplo, para Collins y Kempton

(1920) la segregación del tipo de espiga muestra una variación continua, mientras que la de la espiguilla es mendeliana, siendo dominante la de tipo simple con respecto a la de tipo apareado. Langhan (1940) describe la herencia de ambos caracteres como 'unifactorial'. En cambio, para Rogers (1950) los dos caracteres no segregan de forma mendeliana. Para Galinat (1978) ambos caracteres están controlados por dos genes. Finalmente, para Szabó y Burr (1996) muestran una herencia mendeliana, siendo dominante la espiga con dos hileras con respecto a la de muchas hileras, las espiguillas simples sobre las apareadas y las glumas desarrolladas sobre las no desarrolladas.

Como puede deducirse, las teorías evolutivas basadas en las características morfológicas de las especies parentales y sus descendientes no han dado aún explicaciones claras y contundentes sobre el origen del maíz, siendo en muchos casos los resultados y conclusiones de los distintos autores claramente contradictorios, motivo por el cual se buscan otras alternativas de estudio para tratar de dilucidar este misterio.

6 Estudios moleculares del origen del maíz

Doebley y colaboradores, mediante la identificación de QTL en cada uno de los diez cromosomas de poblaciones primitivas de maíz, teosinte y sus descendientes, estudiaron la herencia de caracteres relacionados con la evolución morfológica (Doebley *et al.*, 1991, 1994, 1995). Como resultado de sus investigaciones concluyeron que los genes involucrados en la evolución morfológica del maíz están distribuidos en todo el genoma, teniendo mayor incidencia cinco o seis bloques de genes con múltiples zonas de ligamiento.

Del análisis de las regiones de ligamiento llegaron a la conclusión de que los genes que determinan las diferencias en la arquitectura de la planta se encuentran en el brazo largo del cromosoma 1 (1L); los que determinan el número de hileras de la espiga en el brazo corto del cromosoma 2 (2S); y los responsables de la formación de la cúpula en el brazo corto del cromosoma 4 (4S). Además, hay regiones cromosómicas (e.g., 1S, 3L y 5S) que tienen efecto sobre múltiples caracteres. Entre ellas, se destaca la presencia en el cromosoma 1 (1L) del gen *tb1*.

El mutante de maíz *teosinte branched 1* no sólo tiene una espiga similar a la de los teosintes, sino también una arquitectura de la planta más propia de los teosintes que del maíz (Doebley *et al.*, 1997), por lo que se piensa que el gen en cuestión (*tb1*) está íntimamente relacionado con la evolución de la panoja y la espiga del maíz (White, 2001). Tras la clonación del gen, el grupo de Doebley procedió al análisis de la variación tanto en la región codificante del mismo como en las regiones de control en 5' en distintas poblaciones de maíz y teosintes. Para su sorpresa, los resultados indicaron que el cambio fenotípico no radica en la secuencia codificante sino en variaciones en las secuencias reguladoras en 5' del gen en cuestión (Wang *et al.*, 1999; Doebley, 2004). Así pues, cambios en la regulación del gen *tb1* producen cambios morfológicos importantes sobre la espiga, lo que habría producido la diferenciación de la espiga de maíz de sus antecesores silvestres teniendo a su vez efectos pleiotrópicos sobre otros caracteres del maíz.

En trabajos ulteriores del grupo de Doebley se intentó identificar la secuencia reguladora responsable del efecto dramático que produce el gen *tb1*. Los autores no consiguieron clonar la secuencia en cuestión

pero sí lograron acotar su localización aproximada. Lo sorprendente es que la secuencia reguladora está situada a unas 60 – 70 kb de la secuencia codificante del gen. (Clark *et al.*, 2006). Sorprende más aún, si cabe, el hecho de que dicha secuencia está situada en medio de una maraña de elementos transponibles, a la que de forma bastante acertada Meaux (2006) califica como ‘jungla’ de DNA.

En maíces antiguos el gen *tb1* habría reducido los órganos florales en cambio, en el mutante están bien desarrollados, de lo que se deduce que este gen tendría un efecto de regulación negativa sobre el crecimiento de los órganos. Otro efecto interesante de este gen es que transforma la inflorescencia femenina en panoja y espiga o produce una espiga anormal (Calderon-Urrea y Dellaporta, 1999).

Para varios autores (Doebley *et al.*, 1993, 1995; Hubbard *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2004; Lukens y Doebley, 1999; Wang *et al.*, 1999) el gen *tb1* ha sido objeto de la selección humana lo que ha producido una importante reducción en su variabilidad genética con respecto a los teosintes y un cambio de función en el maíz.

Por otro lado, estudios recientes de la arquitectura de la gluma han demostrado que estaría regida por el gen *teosinte glume architecture 1 (tga1)* que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 4 cerca del centrómero, teniendo un efecto pleiotropico sobre otros genes (Dorweiler, 1993; Dorweiler y Doble, 1997). El número de hileras y la cúpula estarían regidos por el gen *zfl₂* que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 2 segregando en forma mendeliana (Galinat, 1977; Doebley y Stec, 1993), estando inversamente relacionado el número de genes silvestres que posee la especie con el número de hileras de la espiga (Bomblies *et al.*, 2003).

La desarticulación de la espiga es un carácter complejo, no habiéndose aún establecido a ciencia cierta el modo de herencia ni la ubicación del gen o genes que controlarían el carácter.

7 Estudio genómico de *Zea*

El Género *Zea* se caracteriza por mostrar una amplia variación en el tamaño del genoma tanto a nivel intraespecífico como interespecífico, no estando correlacionado su tamaño con el número cromosómico. Analizando el contenido de DNA de maíces y teosintes se pudo deducir que uno de los genomas más pequeños (5,75 picogramos por genomio haploide) es el de *Zea perennis* ($2n=40$) (Laurie y Bennett, 1985; Tito *et al.*, 1991; Poggio *et al.*, 1998).

Las variaciones en el tamaño del genoma se deberían fundamentalmente a variaciones en el contenido de heterocromatina de los cromosomas, sobre todo de aquellas zonas que tienen secuencias repetidas en tándem (Flavel, 1986; Price 1988; Tito *et al.* 1991; Rosato *et al.*, 1998). En cambio para San Miguel *et al.*, 1996, 1998; Okagaki y Phillips, 2004, en genomas complejos como los de los eucariotas, aún no se conoce con exactitud cuál es la organización relativa de los genes y la función del DNA repetido.

Analizando los retrotransposones *Adh1* y *v22* en maíces que tenían entre 10 a 30.000 copias en distintas partes del genoma, no hallaron cambios importantes en las funciones de los genes, aunque se incrementaba en forma considerable el tamaño del genoma (50 a 60%) en función del número de retrotransposones (San Miguel *et al.*, 1996).

Otras regiones con secuencias altamente repetidas que pueden inducir variaciones en el tamaño del genoma son los *knobs*. En el maíz y especies silvestres del género *Zea* y *Tripsacum* tienen una ubicación característica en cada línea, población o especie (Kato, 1976; Molina, 1976; Mc Clintock, 1981; Molina *et al.*, 1983; Ananiev *et al.*, 1998). Por ello, se los ha utilizado como marcadores citológicos para diferenciar razas, líneas, poblaciones y especies.

Los cromosomas de maíz y las especies silvestres se diferencian fundamentalmente por la ubicación de los *knobs*, siendo en la mayoría de los casos subterminales en el maíz y terminales en las especies silvestres (Molina, 1983, 1985, 1986; Molina y Rosales, 1983; Molina y García, 1999, 2000, 2001).

El tamaño de los *knobs* puede verse afectado por diversos factores: ambientales (Poggio *et al.*, 1998), interacción núcleo–citoplasmática (Mazoti, 1954a-b, 1963; Mazoti y Velásquez, 1963), genéticos (Rhoades, 1942, 1978; Yu *et al.*, 1998), hibridaciones interespecíficas o intergenéricas (Molina *et al.*, 2004, 2005) y presencia de cromosomas B (Buckler *et al.*, 1999; Peacock *et al.*, 1981).

En la mayoría de las especies los *knobs* son inactivos. Sin embargo, en *Zea* algunos autores han observado cambios en la tasa de recombinación genética en regiones particulares del complemento cromosómico cuando se encuentra en el genoma el cromosoma 10 anormal (*Ab10*) (Rhoades, 1978). En estos casos, se produce una segregación diferencial, debido a que se modifica la actividad de los *knobs* que se transforman en centrómeros facultativos o 'neocentrómeros' (Buckler *et al.*, 1999), estando a su vez

correlacionada la velocidad de movimiento de los cromosomas anafásicos con el tamaño de los *knobs* (Yu *et al.*, 1997).

A nivel de secuencias, en la región de los *knobs* se encontraron dos familias de DNA repetidas en *tandem*, una de 180 pares de bases y otra de 350 pares de bases, también denominada TR-1 (Chen *et al.*, 2000).

La secuencia de 180 pares de bases se encontró en maíz, teosintes y *Tripsacum*, pero no en sorgo y *Coix* (Dennis y Peacock, 1984), pudiendo presentar pequeñas variantes en distintos genomas de maíz cuando esta presente el cromosoma anormal *Ab10* (Buckler *et al.*, 1999) o cuando tienen uno o más cromosomas B (Peacock *et al.*, 1981), en cuyo caso pueden llegar a tener hasta 185 pares de bases.

La secuencia de 350-pb hallada en el *knob* del cromosoma 9 de maíz, tiene dos segmentos, uno de 31-pb y otro de 12-pb, homólogos a los de la secuencia de 180-pb anteriormente mencionada. De ello puede deducirse que la secuencia de 180-pb se ha conservado en el tiempo modificándose por duplicaciones, deleciones o divergencias en la secuencia de sus bases (Ananiev *et al.*, 1998 a-b).

Estudios recientes han diferenciado en el DNA de los *knobs* de 350-pb (TR-1) tres tipos de secuencias o componentes con diferente número de bases. El componente A (67-pb), el B (184-pb, 115 o 108-pb) y el C (108-pb), los cuales se combinan entre si de diversas maneras para dar distintos tipos de *knobs* (Hsu *et al.*, 2003).

El polimorfismo y la compleja estructura del DNA de los *knobs* de los maíces, indicarían que pueden tener alguna de las propiedades de los elementos transponibles (Ananiev *et al.*, 1998a-b).

8 Evidencias citológicas de la poliploidía en el género *Zea*

La poliploidía es uno de los mecanismos más frecuentes en la evolución de las especies vegetales, siendo poliploides el 70% de las angiospermas y un elevado porcentaje de plantas de valor económico (Soltis y Soltis, 1999; Liu *et al.*, 2006).

Darlington (1956) puntualiza que inferir el número básico de un poliploide es un paso muy importante en la evolución cromosómica de las especies, ya que muchas especies diploides que desaparecieron en el proceso evolutivo dieron lugar a especies poliploides, o a poliploides que han experimentado un proceso de diploidización, quedando en la actualidad sólo rastros de su origen evolutivo que pueden inferirse con estudios cromosómicos o genómicos tanto de la especie en cuestión como de especies relacionadas.

Estudios genéticos, citológicos y bioquímicos han aportado pruebas que hacen suponer la naturaleza poliploide de *Zea* (Rhoades, 1951; Ghatnekar, 1965; Vijendra Das, 1970; Gottlieb, 1862; Bennett, 1983, 1984; Molina y Naranjo, 1987; Molina y García, 1999, 2000, 2001; Molina *et al.*, 2004).

En la actualidad existen cinco tipos de evidencias citológicas que apoyan el origen poliploide de *Zea*:

1. Apareamiento cromosómico en haploides de maíz.

2. Apareamiento de cromosomas homeólogos.
3. Asociación secundaria.
4. Distribución tridimensional de los cromosomas.
5. Genes duplicados

8.1 Apareamiento cromosómico en haploides de maíz.

McClintock (1930, 1933) analizó el apareamiento cromosómico de haploides de maíz hallando en paquiteno un alto porcentaje de células donde los cromosomas se apareaban como si fuesen homólogos. Chaganti (1965) realizó un detallado estudio del apareamiento cromosómico en metafase-anafase I de haploides de maíz, observando apareamiento entre cromosomas homólogos u homeólogos en un 30% de las células.

Observaciones en paquiteno revelaron un ocasional apareamiento intra e intercromosómico en haploides de maíz (Ting, 1966, 1985; Ford, 1970; Weber y Alexander, 1972), formación de complejo sinaptonémico (Ting, 1973), ocurrencia de dos o más entrecruzamientos, (Ting, 1969; Ford, 1970) y translocaciones entre cromosomas no homólogos (Weber y Alexander, 1972).

Este tipo de apareamiento es frecuente cuando los haploides proceden de una especie que tiene un origen auto o aloploiploide, apareándose en el complemento haploide los cromosomas homólogos u homeólogos (John y Lewis, 1965). Este tipo de apareamiento sólo ocurre excepcionalmente en haploides de especies con un origen diploide, como por ejemplo haploides de centeno (Levan, 1942; John y Lewis, 1965; Puertas y Giraldes, 1979). Kimberg y Riley (1963) proponen tres posibles causas de este fenómeno: 1) apareamiento entre cromosomas que comparten segmentos cromosómicos duplicados; 2) cromosomas

que han tenido un origen aneuploide; 3) origen poliploide arcaico. En cambio, para Jhon y Lewis (1965) la asociación meiótica en haploides procedentes de diploides se debería a la adhesión de las zonas heterocromáticas de los cromosomas.

8.2 Apareamiento de cromosomas homeólogos

La combinación de genomas de diferentes especies ofrece grandes posibilidades de adaptación a un organismo aloploiploide, tanto por causas de tipo genético como epigenético (Comai, 2005). Por lo que se refiere a las primeras, la formación de un aloploiploide puede inducir cambios casi inmediatos durante la meiosis debido a:

1. Los dos juegos de cromosomas homeólogos son muy similares, lo que induce al apareamiento total o parcial de los mismos, produciéndose complejas configuraciones meióticas que dan como resultado gametos desequilibrados, progenies aneuploides (Ramsey y Schemske, 2002), reordenamiento de los cromosomas (Benavente *et al.*, 2001; Sánchez-Moran *et al.*, 2001) y variaciones en la fertilidad (Gillies, 1989; Ramsey y Schemske, 2002).
2. El control preciso del apareamiento cromosómico, restringiendo el mismo sólo a cromosomas homólogos, siendo esto un prerrequisito para dar estabilidad meiótica y reproductiva a los poliploides. En este último caso los aloploiploides presentan un comportamiento meiótico similar al de un diploide, apareándose solamente los cromosomas homólogos. Es probable que este comportamiento se deba a alguno de los siguientes mecanismos:
 - Los cromosomas homeólogos han divergido estructuralmente, ya sea por eliminación de secuencias, reordenamientos, cambio

de funciones de los genes con un origen evolutivo común al provenir del mismo ancestro, etc. (Feldman *et al.*, 1997, Salinas *et al.*, 2004), lo que hace que el poliploide se comporte como si fuese un diploide.

- Genes supresores del apareamiento homeólogo, como por ejemplo el gen *Ph1* que impide el apareamiento homeólogo en trigo (Riley y Chapman, 1958; Sears y Okamoto, 1958). En trigos nulisómicos del cromosoma 5B se producen apareamientos cromosómicos tanto bivalentes como multivalentes. Resultados similares se han hallado en otras especies como cebada, algodón, tabaco, festuca, ballico (*ryegrass*) y *Aegilops* (Jenczewski y Alix, 2004). En la mayoría de estas especies la diploidización citológica esta controlada por genes que tienen efecto sobre los diferentes procesos de la interfase premeiótica o sobre la profase meiótica (Jenczewski y Alix, 2004) y no siempre interactúan en forma aditiva (Mello-Sampayo y Canas, 1973). Recientemente Griffiths *et al.*, 2006 clonaron el gen *Ph1*, caracterizando la función reguladora del apareamiento homeólogo en trigo, y comprobaron que en todas las especies poliploides la regulación de los genes supresores del apareamiento homeólogo no es siempre la misma.

8.3 Asociación secundaria

Kuwada en 1910, fue el primero en observar la asociación secundaria en cromosomas meióticos de *Oryza sativa*. Darlington (1928) y Lawrence (1931) definieron a la asociación secundaria como la afinidad específica que tienen los cromosomas homeólogos para agruparse a pares al final de profase I y en metafase I de la meiosis.

Para Darlington (1956) una manifestación del origen poliploide de una especie diploide, es la aparición de apareamiento secundario o asociación secundaria en la primera metafase meiótica. En cambio para Ford (1970) la asociación secundaria se produce por la atracción residual de los cromosomas homeólogos al compartir segmentos cromosómicos homólogos.

Un importante número de citogenetistas han observado asociación secundaria en diferentes especies, como por ejemplo en *Pyrus* (Darlington y Moffett, 1930), *Brassica* (Catcheside, 1937), *Oryzae* y *Zinzaniae* (Hirayoshi, 1957), *Ricinus* (Kurita, 1946; Jacob 1957), *Luzula* (Brown, 1950) y *Triticum* (Riley, 1960). Aunque sus opiniones están divididas, la mayoría considera a la asociación secundaria como la expresión residual de la homología secundaria, mientras que para la minoría es el producto de la distribución al azar de los cromosomas.

Ghanetkar (1965), Vijendra Das (1970) y Ford (1970) observaron asociación secundaria en maíces, hallando hasta un máximo de cinco grupos de dos bivalentes cada uno en diacinesis. Molina y Naranjo 1987; Molina *et al.*, 2004, 2005 observaron asociación secundaria en maíz, especies silvestres y las F1 obtenidas por la hibridación entre ellas, lo que apoyaría la teoría de Vijendra Das que propone que el maíz es un poliploide con $X=5$.

8.4 Distribución tridimensional de los cromosomas en metafase mitótica

Bennett (1983, 1984), analizando la reconstrucción tridimensional de células en metafase mitótica, observó que los cromosomas de maíz se ubicaban en cuatro grupos de 5 cromosomas cada uno o en dos grupos de 10 cromosomas. Con esta información elaboró una teoría

para predecir la homeología intraespecífica de una especie teniendo en cuenta la ubicación espacial de los cromosomas, el número básico de la especie y la asociación secundaria. En el caso de *Zea mays* sugiere que es un tetraploide con una considerable homología entre sus cromosomas homeólogos, correspondiendo la distribución espacial observada a dos cariotipos de 5 cromosomas homeólogos cada uno.

La separación concéntrica de los genomios es común en algunos híbridos, habiéndose observado en metafases mitóticas de maíz, cebada y en híbridos de cebada por *Secale africanun* (Bennet, 1983).

Molina y Naranjo (1987) y Molina *et al.*, (1999, 2001, 2004), al analizar la metafase I en híbridos de maíz por las especies silvestres con $2n=30$, observaron una interesante separación espacial de los genomios, teniendo una clara tendencia a agruparse los cromosomas en los híbridos con $2n=30$ en asociaciones trivalentes, bivalentes y univalentes de cada uno de los genomios.

8.5 Genes duplicados

En una revisión sobre genes duplicados en maíz, Rhoades (1951) puntualiza que en la arquitectura del germoplasma de las especies de *Zea* hay muchas regiones con genes duplicados y que las mismas podrían representar vestigios de su origen anfidiplóide. Gottlieb (1982) analizando diversas enzimas, observó un incremento de las mismas en las especies diploides de maíz, atribuyéndolo al carácter poliploide de la especie.

Cone *et al.*, 1993, estudiando los genes que regulan la pigmentación de la aleurona de los granos de maíz, hallaron que los genes *c1* y *pl* son funcionalmente genes duplicados y controlan al mismo grupo de genes

estructurales antociánicos Comparando la secuencia de bases del cDNA de ambos genes llegaron a la conclusión de que variaban sólo en pocas secuencias producto de deleciones producidas a lo largo de la evolución.

En varias especies vegetales es muy común hallar genes duplicados en tándem (Zhang y Gaut, 2003). Según Morgante *et al.*, 2005, una línea de maíz tiene aproximadamente un 11% de genes duplicados, desconociéndose la función de la mayoría. Messing *et al.*, 2004 calcularon que el maíz tiene aproximadamente unos trescientos genes duplicados en tándem, habiéndose caracterizado algunos de ellos como por ejemplo *R-r* (Robbins *et al.*, 1991), *Rp1* (Ritchter *et al.*, 1995), *PI* (Zhang y Peterson, 2005) y *Al-b* (Yandeau Nelson *et al.*, 2006).

Las duplicaciones de los genes pueden producirse por distintos mecanismos:

- Vía recombinación desigual o no recíproca (Ritchter *et al.*, 1995, Juretic *et al.*, 2005)
- Vía elementos transponibles (por ejemplo en arroz y otras muchas especies).
- Incorporando fragmentos de genes relacionados (Jiang *et al.*, 2004, Juretic *et al.*, 2005)
- A través de los helitrones, un tipo particular de elementos transponibles de clase II que no presentan repeticiones terminales invertidas (TIRs) ni duplicaciones en el sitio de inserción (TSDs) y que se transponen mediante replicación en círculo rodante (Lal *et al.*, 2003; Brunner *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2005; Lal y Hannah, 2005).

Emrich *et al.*, (2007) consideran que el maíz es un tetraploide segmental que contiene un importante número de genes parálogos, entendiendo como tales a aquellos genes que difieren como máximo en un 10% en la secuencias de bases. Estos mismos autores analizaron en la línea B73 los genes NIPs (*nearly identical paralogs*), considerando como tales a los genes parálogos que comparten más de un 98% de la secuencia de sus bases. Una observación interesante es que se ha comprobado que muchos de esos genes se encuentran ligados (Lisch *et al.*, 1995).

Se han observado NIPs con alta frecuencia en dicotiledóneas y excepcionalmente en monocotiledóneas, como por ejemplo el maíz. Emrich *et al.*, (2007) sugieren que la presencia de los NIPs no es universal en las plantas. Paralelamente observan en la línea B73 la presencia de polimorfismos en la posición de los nucleótidos, lo que indicaría que estaríamos en presencia de genes duplicados y que estas duplicaciones se habrían producido recientemente (Fu *et al.*, 2004).

La elevada presencia de NIPs en el genoma de maíz, junto a la expresión diferencial de los genes parálogos, pudo haberle otorgado una ventaja selectiva durante el proceso de domesticación y mejora genética frente a otras especies que han necesitado miles de años para lograr un proceso evolutivo equivalente (Laurie *et al.*, 2004).

9 Homología críptica en *Zea*

La colchicina es comúnmente utilizada para inducir la poliploidización de una especie y, en particular, para la obtención de anfidiploides a partir de híbridos interespecíficos (Bradley y Goospeed, 1943). Cuando se aplica antes de la mitosis premeiótica las células duplican su número cromosómico observándose en híbridos interespecíficos

duplicados la formación de bivalentes (Bradley y Goodspeed, 1943; Driscoll y Barber, 1967; Feldman y Avivi, 1988).

Por otro lado, está demostrado que tratando células premeióticas con solución diluida de colchicina (0,5 al 1%) se reduce el apareamiento de los cromosomas homólogos, induciendo asinápsis parcial (Driscoll y Barber, 1967), pero no se ve afectado el apareamiento intracromosómico en los isocromosomas (Driscoll y Darvey, 1970).

Concentraciones de colchicina de $0,5 \times 10^{-4}$ M inducen al apareamiento de los cromosomas homeólogos, formándose multivalentes o bivalentes heteromórficos (Driscoll y Barber 1967; Feldman y Avivi 1988), lo que favorece el apareamiento intergenómico de especies que tienen genomios homeólogos (Jackson y Murray, 1983).

Según Dover y Riley (1973) esta técnica permite la expresión de la homología críptica entre genomios homeólogos y provee un mecanismo de posible intercambio de material genético entre genomas aislados en términos evolutivos.

Driscoll y Darvey (1970) observaron que la colchicina afecta a la relación espacial de los cromosomas homólogos pero no la formación de los quiasmas. Por otro lado, sugieren que la posición de los cromosomas tiene vital importancia en el apareamiento meiótico de los cromosomas homólogos y homeólogos produciendo una alteración en el ordenamiento de los cromosomas en la membrana nuclear, lo que permitiría la expresión de la homología genómica críptica.

De acuerdo con Feldman y Avivi (1988) la colchicina interfiere en el ordenamiento de los cromosomas en interfase y en los mecanismos

presinápticos necesarios para que se produzca apareamiento meiótico. La mayoría de estos estudios se han realizado en trigo (*Triticum aestivum*) donde el gen *Ph1* localizado en el brazo largo del cromosoma 5B, impide el apareamiento de los cromosomas homeólogos.

Jackson (1982) describe un modelo que explicaría el apareamiento cromosómico y la formación de quiasmas en genomas homólogos u homeólogos. Según este modelo los genomas controlan los sitios específicos de unión de los cromosomas a la membrana nuclear, estando este mecanismo regulado por el gen *Ph* (en el caso del trigo) o genes similares (en otras especies).

Jackson y Murray (1983) demostraron que la aplicación de solución de $0,5 \times 10^{-4}$ M de colchicina aplicada en células meióticas puede romper el control genético del apareamiento meiótico promoviendo el apareamiento intergenómico y revelando la homología críptica en especies poliploides. Utilizando esta técnica indujeron la formación de tetravalentes en *Helianthus*, interpretando que esta es una evidencia de la condición poliploide ancestral de la especie. Murray *et al.* (1983), usando el mismo tratamiento en otras especies observaron un incremento de la frecuencia de tetravalentes debido probablemente a la disrupción del mecanismo que promueve el apareamiento de los bivalentes.

Estudios recientes han demostrado que el apareamiento de los cromosomas está precedido de una profunda reorganización cromosómica en cigoteno temprano, produciendo como resultado la unión de los telómeros en una especie de *bouquet* (Zickler y Kleckner, 1998; Bass *et al.*, 2000), lo que facilitaría el apareamiento de los

cromosomas homólogos (Loidl, 1990; Bass, 2003), siendo este mecanismo independiente del inicio de la recombinación (Harper *et al.*, 2004).

La unión de los telómeros para formar el *bouquet* es un mecanismo universal de la profase meiótica, aunque todavía no se conoce muy bien cómo se produce. Cuando se trata la célula con colchicina antes de la formación del *bouquet* se depolimerizan los microtúbulos y se inhibe la formación del mismo. Si el tratamiento es posterior a la formación del *bouquet*, la colchicina no afecta la formación del mismo y, como consecuencia, no se ve afectada la división meiótica (Cowan y Cande, 2002).

En el maíz, el gen *pam1* (*plural abnormalities of meiosis 1*) es el que parece intervenir en la formación del *bouquet*, en el anclaje de los telómeros a la membrana nuclear y el que facilita el apareamiento de los cromosomas homólogos. La mutación de este gen produce alteraciones en el apareamiento de los cromosomas homólogos, irregularidades en el anclaje de los telómeros, apareamiento entre cromosomas no homólogos y prolonga la profase I. Golubovskaya *et al.*, 2002, llegan a la conclusión de que el gen *pam1* participa en el control de la formación del *bouquet* y en el apareamiento de los cromosomas homólogos en las distintas etapas de la profase I de la meiosis (Bass *et al.*, 2000).

Estudios citogenéticos previos realizados en el género *Zea* por nuestro grupo de trabajo han aportado evidencias de que el número básico original de este género sería igual a 5, postulando que el maíz y las especies silvestres relacionadas con $2n=20$ son alotetraploides crípticos que se habrían originado a partir de cruzamientos entre

especies diploides posiblemente extinguidas con $2n=10$ (Molina y Naranjo 1987, Naranjo *et al.*, 1989).

Poggio *et al.*, 1990; Molina y García, 1999, 2000, 2001; Molina *et al.*, 2004, 2005; tratando células premeióticas de *Zea mays*, *Z. perennis*, *Z. diploperennis* y sus híbridos con soluciones diluidas de colchicina, se indujo el apareamiento de los cromosomas homeólogos, habiéndose observado tanto en el maíz como en los híbridos con $2n=20$ hasta 5 tetravalentes, mientras que en *Zea perennis* aumentó el número de tetravalentes con respecto a los que aparecen cuando no se realiza dicho tratamiento. El tratamiento con colchicina favoreció el apareamiento de los cromosomas homeólogos, debido posiblemente a una modificación de la posición de los cromosomas la membrana nuclear Bass *et al.*, 2000, como consecuencia de la anulación de expresión de un gen del maíz similar al gen *Ph* del trigo (Poggio *et al.*, 1990, Molina *et al* 2004) o a la alteración de la formación del *bouquet* (Bass *et al.*, 2000). En la presente tesis doctoral se ha tratado de profundizar en el análisis de la homología críptica de especies e híbridos del Género *Zea* a fin de avanzar en el conocimiento del origen evolutivo del maíz y su relación filogenética con especies afines.

HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS



1 Hipótesis de trabajo

El Género *Zea* es uno de los más estudiados a nivel morfológico, genético, citogenético, molecular y bioquímico. A pesar de ello, aún hay grandes dudas y controversias con respecto al origen del maíz (Mangelsdorf y Reeves, 1940, Mangelsdorf, 1983; Wilkes, 1979; Beadle, 1970; Iltis 1981; Doebley *et al.*; 1991,1994, 1995; Doebley 2004, Gore *et al.*, 2009), su nivel de ploidía (Molina y Naranjo, 1987; Molina y García, 1999, 2000, 2001; Molina *et al.*, 2004, 2005), el comportamiento de los cromosomas homeólogos de las distintas especies en los híbridos interespecíficos y el grado de homología críptica de los cromosomas homeólogos en las distintas especies del Género *Zea* (Poggio *et al.*, 1990, Molina *et al.*, 2004).

Con el fin de aportar información que ayude a aclarar algunas de estas incógnitas, y teniendo en cuenta la información previa tanto de trabajos propios como de otros autores, se propone como hipótesis de la tesis doctoral, lo siguiente:

- Las especies del Género *Zea* han tenido un origen común, habiéndose diferenciado fenotípicamente a lo largo de su proceso evolutivo pero conservando la homología u homeología cromosómica.
- Los híbridos del Género *Zea* con el mismo nivel de ploidía, con independencia de las especies parentales que hayan dado lugar a tales híbridos, tienen un comportamiento cromosómico similar.

2 Objetivos

2.1 Objetivo general

El objetivo general de los estudios citogenéticos realizados en el contexto de este trabajo de tesis es llegar a dilucidar la organización

genómica de las especies del Género *Zea* y la diferenciación producida durante el proceso evolutivo, para inferir el posible origen alopoliploide del complejo *Zea* y las relaciones evolutivas existentes entre las distintas especies

2.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos de esta investigación son:

- Analizar el comportamiento fenotípico, genotípico y citogenético de especies e híbridos del Género *Zea* con el fin de aportar información que contribuya a dilucidar las relaciones filogenéticas entre las especies del complejo *Zea*, su nivel de ploidía y la posible diferenciación en la evolución de los genomios homeólogos.
- Inducir con soluciones diluidas de colchicina, u otros agentes antimitóticos, el apareamiento intergenómico críptico de los genomios homeólogos de las especies e híbridos del género *Zea*.

MATERIALES Y METODOS



•

1 Materiales

1.1 Especies parentales

1.1.1 Sección *Zea*

***Zea mays* spp *mays* 2n=20 (Zm20)².** Se ha utilizado la población Colorado Klein y la línea *knobless* proveniente del Maize Genetic Cooperation Stock Center (Urbana, Illinois, USA).

***Zea mays* spp *mays* 2n=40 (Zm40).** Se utilizaron las líneas de maíz *sugary* N103A, N104B, N107C, N107B y 90-2189-2190, donadas por Maize Genetic Coop. Stock Center (Urbana, Illinois, USA).

***Zea mays* ssp *mexicana* 2n=20 (Zmex).** Cedida por el CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, México).

***Zea mays* ssp *parviglumis* 2n=20 (Zpar).** Amablemente cedida por el Dr. Bird del CIMMYT.

1.1.2 Sección *Luxuriante*

***Zea luxurians* 2n=20 (Zl).** Proviene de Guadalajara, México. Es un cultivar del Instituto Fitotécnico de Santa Catalina.

***Zea diploperennis* 2n=20 (Zd).** Originaria de las Sierras Occidentales de Manjatlan, a 2 Km. de las Joyas, Jalisco, México. Cedida por el Dr. Iltis.

***Zea perennis* 2n=40 (Zp).** Originaria de Ciudad Guzmán, Jalisco México. Cedida por la Dra. Prywed e introducida por el Dr. Rossi al Instituto Fitotécnico de Santa Catalina, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de la Plata en 1962.

²En *Zea mays* y en los híbridos que son producto del cruzamiento entre las mismas especies, pero tienen distinto número cromosómico, para diferenciarlos se le ha agregado en la abreviatura el número cromosómico correspondiente, por ejemplo en los híbridos entre *Zea mays* por *Zea perennis* con 2n=30 y 40, se los ha abreviado como ZmxZp30 y ZmxZp40.

1.2 Híbridos

Se cruzaron entre si las distintas especies de *Zea* obteniéndose los siguientes híbridos:

1.2.1 Dihíbridos

1.2.1.1 Con $2n=20$

Zea mays spp *mays* por *Zea mays* spp *mexicana* (ZmxZmex).

Zea mays spp *mays* por *Zea mays* spp *parviglumis* (ZmxZpar20).

Zea mays spp *mays* por *Zea luxurians* (ZmxZl).

Zea mays spp *mays* por *Zea diploperennis* (ZmxZd20).

Zea diploperennis por *Zea luxurians* (ZdxZl).

Zea mays spp *parviglumis* por *Zea diploperennis* (ZparxZd20).

1.2.1.2 Con $2n=30$

Zea mays spp *mays* ($2n=40$) por *Zea mays* spp *mays* ($2n=20$), (ZmxZm30).

Zea mays spp *mays* por *Zea mays* spp *parviglumis* (ZmxZpar30).

Zea mays spp *mays* por *Zea perennis* (ZmxZp30)

Zea diploperennis por *Zea perennis* (ZdxZp30).

Zea luxurians por *Zea perennis* (ZlxZp).

Zea perennis por *Zea mays* ssp. *mexicana* (ZpxZmex).

1.2.1.3 Con $2n=40$

Zea mays con $2n=40$ por *Zea perennis* (ZmxZp40)

Zea mays spp *parviglumis* por *Zea diploperennis* con $2n=40$, obtenido por duplicación cromosómica del híbrido con $2n=20$ (ZparxZd40).

Zea diploperennis por *Zea perennis*, obtenido por el cruzamiento entre un gameto no reducido de *Zea diploperennis* por un gameto normal de *Zea perennis* (ZdxZp40).

1.2.2 Trihíbridos

1.2.2.1 Con $2n=20$

Híbrido entre *Zea mays* variedad “Colorado Klein” por *Zea diploperennis*, cruzado con *Zea luxurians* (MDL).

1.2.2.2 Con $2n=40$

Zea mays spp *mays* $2n=40$ por el híbrido entre *Zea diploperennis* por *Zea perennis* con $2n=40$ (MDP).

2 Métodos

2.1 Experimentos de campo

Los materiales fueron sembrados en el campo y en el invernáculo, donde se realizaron las autofecundaciones en líneas de maíz y las poblaciones de Teosinte, así como los cruzamientos intra e interespecíficos entre especies del Género *Zea*.

2.1.1 Autofecundaciones y cruzamientos utilizando a maíz como progenitor femenino

Se taparon las espigas antes de la emergencia de los estigmas, cubriéndolas con bolsa siliconadas para evitar la polinización libre. Cuando emergieron los estigmas se realizó la polinización controlada con el polen maduro del progenitor masculino deseado.

Si se utilizaba como progenitor masculino alguno de los Teosintes, antes de la polinización se cortaban los estigmas de maíz a un tamaño de 3 o 4 cm., debido a que los Teosintes emiten un tubo polínico cuya longitud máxima es de 6 a 7 cm., a diferencia del de maíz que puede medir más de 30 cm.

Cuando se cruzaron especies que dan como resultado híbridos con $2n=30$ cromosomas, en la mayoría de los casos, solo se obtuvo al híbrido rescatando al embrión y cultivándolo *in vitro*.

2.1.2 Cruzamientos utilizando como progenitor femenino cualquiera de los Teosintes.

Los Teosintes se caracterizan por tener varias espigas por tallo y, a su vez, en cada uno de los nudos reproductivos suelen tener dos o tres espigas mixtas. Antes de la emergencia de los estigmas, hay que eliminar las flores masculinas de las espigas mixtas para evitar la autopolinización dentro de la bolsa de cruzamiento.

2.2 Fijación de panojas para estudios meióticos

Cuando las líneas e híbridos del género *Zea* comenzaron a emitir las inflorescencias masculinas, se cortaron las panojas inmaduras y se fijaron en solución Farmer (3:1 alcohol etílico:ácido acético glacial), conservándose en esta solución entre 8 o 10 días. Posteriormente se las pasó a una solución de alcohol (70 %), conservándolas a 4°C hasta su observación.

2.3 Preservación de las semillas

Las semillas de líneas e híbridos se cosecharon y desecaron (menos de 11% de humedad relativa) conservándose en oscuridad a 4°C.

2.4 Fertilidad del polen

La fertilidad del polen fue determinada con solución de Lugol (Reynolds, 1989; Alvarez Rabanal, 1998), considerándose que el grano de polen era fértil cuando se coloreaba como mínimo las tres cuartas partes del mismo.

2.5 Germinación *in vitro* del tubo polínico

Se cosechó polen maduro, se lo dejó dos horas a temperatura entre 25 a 30°C, se lo paso por tamices para eliminar los elementos extraños (anteras, insectos, etc.) y se lo colocó en el medio de cultivo de Walden (Tabla 1, ver anexo) dejándolo germinar a temperatura ambiente aproximadamente 4 h. Para facilitar la observación en la lupa o microscopio se lo tiñó con solución de Lugol. Conservándolo fijado en solución Farmer.

2.6 Análisis citogenéticos

2.6.1 Preparaciones citológicas para estudios mitóticos

Las semillas de líneas e híbridos de *Zea* se sembraron en caja de Petri estériles con papel de filtro embebido en agua destilada, poniéndolas a germinar en cámara de cultivo con luz y temperatura controlada.

Cuando las raicillas alcanzaron aproximadamente 1 cm. de largo, se cortaron los ápices y pretrataron con solución saturada de paradiclorobenceno (P.D.B.) a temperatura ambiente durante 3 – 4 h. Posteriormente se enjuagaron dos o tres veces con agua destilada hasta eliminar el paradiclorobenceno y se fijaron en solución Farmer durante 24 – 48 horas, conservándose hasta su utilización en alcohol (70 %) a 4°C.

Las preparaciones citológicas se realizaron de la siguiente manera: Las raíces fijadas se lavaron con agua destilada o solución tampón Mc Ilvaine (citrato sódico 0,01 M, pH 4,6 ver anexo) para remover el fijador. Para eliminar la celulosa y pectina de las raicillas, se realizó la maceración con una solución de ácido clorhídrico 5N a temperatura ambiente durante 30 – 40 minutos o con una solución enzimática conteniendo 2% de celulasa (Onozuka R10) y 20% de pectinasa

(Sigma P4716) a 37°C durante 30 minutos. A continuación se enjuagaron con agua destilada o solución tampón Mc Ilvaine y se tiñeron con una solución de hematoxilina férrica o carmín acético utilizando como mordiente una solución de ácido férrico (ver anexo).

2.6.2 Preparaciones citológicas para estudios meióticos.

Para analizar las configuraciones meióticas de especies parentales e híbridos se separaron las anteras de las flores masculinas fijadas previamente en solución Farmer. Las anteras se aplastaron en una gota de hematoxilina férrica al 2% o en carmín acético, utilizándose como mordiente una microgota de ácido férrico (ver anexo). Se cubrió con un cubreobjeto, analizándose en microscopio óptico de luz directa.

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

2.6.3 Tratamiento con solución diluida de colchicina

Se cortaron panojas inmaduras y se las introdujo en una solución de 0.5×10^{-4} M de colchicina durante 12 h, luego se colocaron en agua destilada durante 24 h y se fijaron en solución 3:1 de alcohol etílico absoluto-ácido acético glacial. El material de control (o testigo) se dejó las 36 horas en agua destilada, fijándose posteriormente en solución Farmer.

2.6.4 Realización de cariotipos, idiogramas y láminas

La determinación de los parámetros del cariotipo se realizó sobre fotografías digitalizadas utilizando el programa 'MicroMeasure' versión 3.3 del Departamento de Biología de la Universidad de Colorado (USA) disponible www.colostate.edu/depts/biology/micromeasure.

La nomenclatura utilizada para la descripción morfológica fue la propuesta por Levan *et al.*, 1964. Las láminas se realizaron con fotografías digitalizadas con el programa.

2.7 Rescate de embriones maduros e inmaduros

Los embriones inmaduros de los híbridos con $2n=30$ se rescataron y cultivaron *in vitro* debido a que entre los 12 y 30 días después de la fecundación se produce el colapso y muerte del embrión *in vivo*. El período de supervivencia de los embriones *in vivo* depende de las condiciones ambientales en que se cultivan las plantas: si es en invernáculo y en época óptima del cultivo, la supervivencia es de 12 días; en cambio, si es en invernáculo en época invernal el crecimiento en general es más lento, sobreviviendo 21 días y en algunos casos extremos hasta 30 días.

Para favorecer el desarrollo del embrión, las espigas se pulverizaron con una solución de 0,45 mM de 2,4-D dos días después de la polinización (Furini y Jewel, 1995).

2.7.1 Organogénesis

Para el rescate de los embriones, se cosecharon las espigas cuando los embriones tenían como máximo 1 mm de longitud, se desinfectaron los cariopses con una solución de 2,5% de hipoclorito sódico y se sembraron en el medio básico de García y Molina (1992) suplementado con $4,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de 2,4-D (Tablas 2 y 3, anexo). Los embriones se incubaron a 28-30°C en una cámara de cultivo con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad, repicándolos cada 30 días en el medio de mantenimiento de callos de maíz (tabla 4, anexo). Las plantas regeneradas se transfirieron a un medio de cultivo sin 2,4-D para

facilitar el desarrollo de raíces (Tabla 5 anexo). Posteriormente se aclimataron y transplantaron al invernáculo (ver anexo).

2.7.2 Embriogénesis somática

Se utilizaron embriones inmaduros de distintas especies e híbridos que medían entre 0,15 y 0,25 mm de longitud (sin contar el suspensor) aislados del cariopse entre 7 y 9 días después de la polinización (si se trataba de las especies parentales) y entre 12 y 21 días después de la polinización (dependiendo del híbrido y las condiciones ambientales reinantes).

El medio de cultivo utilizado fue el N6 (Chu, 1978) y las vitaminas del medio Haagen-Smit (1945) con el suplemento de 1500 mg/L⁻¹ de L-asparagina, 55 g/L⁻¹ de sacarosa, 0,8% de agar y diferentes combinaciones de kinetina y 2,4-D.

2.7.3 Iniciación del cultivo

Los embriones se sembraron con el escutelo y el suspensor intactos y se incubaron desde el comienzo con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad a 28-30°C.

Se calculó la frecuencia de Embriogénesis somática (FE) mediante la fórmula:

$$FE = \frac{\text{Nº de embriones cigóticos con embriogénesis somática}}{\text{Nº total de embriones cigóticos sembrados}} \times 100$$

RESULTADOS



1 Análisis comparativo de los cromosomas del género *Zea*.

Del análisis de los cromosomas de *Zea mays*, *Zea mexicana*, *Zea parviglumis*, *Zea luxurians* y *Zea diploperennis* (todas con $2n=20$) y *Zea perennis* (con $2n=40$), teniendo en cuenta la longitud relativa, la relación entre los brazos y el tamaño y ubicación de los *knobs* (Tablas 5, 6, 7 y Fig.6), se dedujo lo siguiente:

- La longitud relativa y la relación entre los brazos de los cromosomas del maíz y los Teosintes con $2n=20$ son semejantes, a excepción del cromosoma 5 que tiene distinta relación entre los brazos.
- La diferencia fundamental entre los cromosomas del maíz y los Teosintes se halló en la posición de los *knobs*, mientras que el maíz carecía de *knobs* o eran subterminales medianos (Tabla 7, Fig. 4A), los Teosintes generalmente, presentaron *knobs* terminales pequeños, medianos o grandes (Tabla 7, Fig. 4B).

Zea mays variedad "Colorado Klein" (Fig. 5A) se caracterizó por presentar *knobs* subterminales medianos en el brazo corto del cromosoma 9 y en el brazo largo de los cromosomas 2, 4, 5, 6, 7 y 8 (Tabla 7).

Zea mexicana (Fig. 5B) tenía *knobs* terminales y de mayor tamaño que el resto de los Teosintes. Se observaron *knobs* terminales en el brazo largo y corto de los cromosomas 1 y 3, en el brazo largo de los cromosomas 2, 4, 5, 6, 8 y 9 y en el brazo corto del cromosoma 7 (Tabla 7).

Zea parviglumis (Fig. 5C) tenía *knobs* terminales pequeños en el brazo largo y corto de los cromosomas 1 y 2, y medianos en el brazo largo de los cromosomas 3, 4, 6, 7, 8, 9 y 10 (Tabla 7)

Zea luxurians (Fig. 5D) tenía *knobs* terminales en el brazo corto y largo del cromosoma 1 y en el brazo largo del resto de los cromosomas (Tabla 7, Fig. 6).

Zea diploperennis (Fig. 5E) se caracterizó por tener *knobs* terminales pequeños en ambos brazos del cromosoma 1, así como en el brazo corto del cromosoma 2 y en el brazo largo del cromosoma 6. Además tenía *knobs* terminales intermedios en los cromosomas 5, 8, 9 y *knobs* terminales muy grandes en el brazo largo del cromosoma 4 y en el cromosoma extra o posible cromosoma B. Los cromosomas 3, 7 y 10 carecían de *knobs* (Tabla 7). En el 3% de las células en diploteno y diacinesis se desprendía el cromosoma organizador del nucleolo formando una nueva estructura nucleolar.

La medición de los cromosomas de *Zea perennis* (Fig. 5F) en paquiteno fue dificultosa debido a que tendían a pegotearse. Tras la medición de 50 células, teniendo en cuenta la longitud total, relación de los brazos y posición de los *knobs* (Tablas 5, 6, 7 y Fig. 6), se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- *Z. perennis* tenía dos cromosomas organizadores del nucleolo (Tabla 7), teniendo una longitud total y relación de los brazos similares, diferenciándose uno del otro porque uno tenía dos pequeños *knobs* en el satélite, mientras que el otro carecía de ellos.
- Los cromosomas de *Zea perennis* tienen *knobs* terminales muy pequeños en ambos brazos, en sólo uno de ellos o carecen de *knobs*, siendo en algunos casos tan pequeños que se confunden con cromómeros grandes (Tabla 7).

- Los pares cromosómicos I-II; III-IV; VII-VIII; IX-X y XV-XVI, son posiblemente los cromosomas tetravalentes observados en diacinesis-metafase I, ya que en paquiteno se aparearon dando la figura típica de un tetravalente, teniendo longitud y relación de los brazos similares.

2 Análisis de las afinidades cromosómicas de especies e híbridos del género *Zea*

Con el propósito de analizar las afinidades cromosómicas del complejo *Zea* se realizaron estudios fenotípicos, cariológicos y citogenéticos de especies e híbridos del Género *Zea* con diferentes niveles de ploidía.

2.1 Especies parentales

2.1.1 Sección *Zea*

Zea mays* ssp *mays

Zea mays ($2n=20-40$) es anual, no hallándose, como ocurre en otras especies, diferencias fenotípicas por el nivel de ploidía. Los cultivares de esta especie presentan una caña principal robusta constituida por 10 – 12 entrenudos (Fig. 5A), habitualmente sin macollos aunque pueden tener unos pocos en caso de tratarse de maíces forrajeros. Las inflorescencias masculinas son panojas apicales laxas presentando en algunos casos anomalías excepcionales, como por ejemplo espiga en lugar de la panoja (Fig. 7A), pudiendo deberse a la expresión de alguno de los mutante del gen *ts* (*tassel seed*) Neuffer *et al.*, 1997 o panoja y espiga (Fig. 7B), siendo semejante al mutante *tel* (*terminal ear*) descrito por Matthews *et al.*, 1974 y Neuffer *et al.*, 1997, siendo esta una anomalía muy frecuentes en los híbridos entre el maíz y los teosintes. Las inflorescencias femeninas son espigas axilares pedunculadas con dos 2 a 3 entrenudos cortos que permanecen unidos al tallo al finalizar el ciclo de la planta. Normalmente tiene una sola espiga por nudo presentando en forma excepcional dos o más espigas en el mismo entrenudo (Fig. 7C). Las espigas son polísticas estando constituidas por un raquis central cilíndrico y prominente con cariopses desnudos que no se desprenden a la madurez (Fig. 2A).

Del análisis de 100 células de maíz con $2n=20$ en los estadios de diploteno, diacinesis y metafase I, en el 40% se observó asociación secundaria, hallándose los cromosomas separados espacialmente en dos grupos de 5 cromosomas cada uno (Fig. 8A).

Del análisis de las configuraciones meióticas de *Zea mays* ($2n=20$) en diacinesis-metafase I (Tabla 8) se dedujo que la totalidad de las células tenían una configuración meiótica de $10II^3$ (Fig. 8A) con un promedio de 14 quiasmas por célula. Las anafases eran regulares migrando 10 cromosomas a cada uno de los polos (Fig. 8B)

En cambio, en *Zea mays* con $2n=40$ habían diferentes configuraciones meióticas, siendo las más frecuentes $10IV$ (30,28) y $9IV + 2II$ (23,94), con un promedio de $0,04I+3,24II+0,04III+8,34IV$ y una baja frecuencia de univalentes y trivalentes (Tabla 9, Fig. 8C), con 33,75 quiasmas por célula. La fertilidad del polen era de un 80% y el de la semilla de un 60%. Las anafases eran regulares, migrando 20 cromosomas a cada uno de los polos (Fig. 8D).

Zea mays ssp mexicana

Zea mexicana tiene un número cromosómico de $2n=20$, es una planta anual, muy parecida al maíz (siendo en muchos casos maleza de este cultivo), mide de 2 a 2,80 m de altura, y fundamentalmente difiere del maíz por sus espigas que miden de 5 a 8 cm. de largo hallándose dispuestas en dos hileras de 5 a 12 granos.

³Las abreviaturas en las configuraciones meióticas significan: I cromosoma univalente, II bivalente, III trivalente, IV tetravalente

Los frutos son cariopsis cubiertos por una gluma endurecida, de forma triangular de 5 a 9 mm de largo y 2 a 4 mm de ancho que se desprenden y caen a la madurez. La floración estaba afectada por el fotoperíodo, comenzando la misma cuando hay menos de 13 h luz.

Del estudio citogenético de 136 células en diacinesis-metafase I, en el 97 % de las células se observaban 10II (Fig. 9A, 9B) y solo en el 3 % se hallaron 9II+2I (Fig. 9C), teniendo un promedio de 0,06I+9,97II (Tabla 10). Los bivalentes presentaron, en un 65% de los casos, una fuerte asociación secundaria o separación en dos grupos de 5 cromosomas cada uno (Fig. 9B), con un promedio de 16,48 quiasmas por célula. La fertilidad del polen fue del 99% y el de las semillas de un 98%.

Las anafases eran regulares migrando 10 cromosomas a cada uno de los polos (Fig. 9D) y solo excepcionalmente se observó un puente de inversión (Fig. 9E), cromosomas retrasados (Fig. 9F) o distinto número de cromosomas en cada uno de los polos.

Zea mays ssp parviglumis

Zea mays ssp parviglumis tiene un número cromosómico de $2n=20$, siendo originaria de Méjico o Guatemala. Es una especie anual, teniendo un ciclo vegetativo largo y coincidente con el del maíz, siendo en muchas oportunidades maleza del mismo, motivo por el cual es combatida por los productores estando en este momento en un franco retroceso en sus lugares de origen.

La población de *Z. parviglumis* cultivada en el IFSC (Fig. 5C) era anual y tenía una enorme variabilidad genética, variando su altura de 2,5 a

3,5 m, con 3 a 10 tallos de color verde oscuro o rojizo, teniendo nudos con raíces adventicias que si se cortaban y colocaban en tierra daban lugar a una nueva planta, y de 8 a 15 hojas por tallo con vainas glabras. La inflorescencia masculina era muy ramificada y la femenina muy prolífica estando compuesta por espigas de 6 a 12 cm. de largo con 6 a 14 granos por espiga. Los cariopses, donde se encontraba encerrado el grano, presentaron una enorme variabilidad en el color y tamaño, caracterizándose por desprenderse y caerse a la madurez. La floración estaba afectada por el fotoperíodo comenzando la misma cuando la longitud del día era de 13 h luz.

Tras el estudio citogenético de 181 células en diacinesis-metafase I, se observaron 10II en el 82 % de las células, 9II+2I en un 13% y 8II+4I en el 5 % restante, teniendo un promedio de 0,46I+9,76II (Tabla 11). Los bivalentes presentaron, en un 70% de los casos, una fuerte asociación secundaria y un promedio de 15,36 quiasmas por célula. La fertilidad del polen era de un 95% y el de las semillas de un 92%.

Las anafases eran regulares, migrando en el 87% de los casos 10 cromosomas a cada uno de los polos; en el 13% restante se observaron cromosomas retrasados o distinto número cromosómico en cada uno de los polos.

2.1.2 Sección luxuriante

Zea luxurians

Zea luxurians es la especie anual con $2n=20$ de la sección Luxuriantes, siendo probable que haya abandonado muy rápidamente el hábito perenne y separado del grupo de los Teosintes perennes como adaptación a las nuevas condiciones de los ambientes

estacionales secos de las regiones altas del sureste de Guatemala. La divergencia entre *Zea diploperennis* y *Zea perennis* se habría producido posteriormente, y posiblemente como consecuencia de la diferencia en el nivel de ploidía entre las dos especies. En este momento, las poblaciones silvestres de *Zea luxurians* se encuentran en un franco proceso de retroceso, corriendo peligro de extinguirse.

(http://www.biodiversityinternational.org/publications/Web_version/266/ch3.htm).

La accesión de *Zea luxurians* cultivada en el IFSC, tenía una altura que variaba entre 1 y 2 m, con 8 a 12 macollos, y los tallos eran delgados con hojas finas de 30 a 65 cm. de largo por 2,5 a 3,5 cm. de ancho (Fig. 5D). La inflorescencia masculina era una panoja apical con pocas ramificaciones. Las inflorescencias femeninas eran espigas de 5 a 8 cm. de largo envueltas con una sola bráctea. Los granos en las espigas estaban dispuestos en dos hileras con 5 a 12 granos cada una, midiendo de 7,5 a 10,5 mm de longitud y 2 a 3,8 mm de ancho. Las semillas estaban encerradas en cariopses cubiertos por una gluma dura que se desprendía y caía a la madurez. La floración estaba influida por el fotoperíodo comenzando la misma cuando había menos de 12 h luz.

Del estudio citogenético en diacinesis-metafase I se dedujo que tenía regularidad meiótica, siendo la configuración meiótica más frecuente de 10II (82%), 9II+2I (14%) y sólo en un 4% 8II+4I, con un promedio de apareamiento cromosómico de $9,78II+0,44I$, (Tabla 12). En anafase I migraban 10 cromosomas a cada uno de los polos y sólo excepcionalmente se observaron cromosomas retrasados. El promedio de quiasmas por célula fue de 15,34, con una fertilidad del polen del 95% y un 90% de fertilidad de las semillas.

Zea diploperennis

Zea diploperennis es una planta perenne que se caracteriza por tener de 1,40 a 2,20 m de altura, macolladora (10 a 20 macollos), con rizomas cortos y definidos (siendo uno de los sistemas de multiplicación de la especie), con tallos delgados, teniendo un promedio de 8 a 12 hojas por tallo (Fig. 5E). La flor masculina era una panoja apical laxa con pocas ramificaciones, las flores femeninas son espigas que nacen, una o más, en cada uno de los entrenudos del tallo. Las espigas tenían entre 4 a 12 cariopses que se desarticulaban y caían a la madurez. La floración estaba influida por el fotoperíodo de día corto (menos de 13 h luz).

Zea diploperennis tenía un número cromosómico de $2n=20$ (Fig.10 A, B) a excepción de una planta que tuvo $2n=21$, siendo este último un cromosoma extra o posible cromosoma B.

Del análisis de 100 células en diacinesis-metafase I, se dedujo que tenía un promedio de $0,52I+9,68II$ (tabla 13), siendo la configuración meiótica más frecuente $10II$ (73% de los casos) (Fig. 10B). En el 27% restante se hallaron hasta 3 univalentes y en el 1% un trivalente (Tabla 13), con un promedio de 14 quiasmas por célula.

En el 90% de las células en anafase I migraban diez cromosomas a cada uno de los polos (Fig. 10C), mientras que en el 10% restante migró un diferente número de cromosomas a cada polo (Fig. 10D). Otras anomalías observadas fueron cromosomas retrasados y, excepcionalmente, puentes de inversión. La fertilidad del grano de polen era del 97% y la de la semilla un 92%.

Zea perennis

Zea perennis (Fig. 5F) es una especie poco conocida tanto morfológica como citológicamente. En trabajos previos se la ha tenido en cuenta fundamentalmente por ser tetraploide, un pariente salvaje del maíz o por los híbridos obtenidos en cruzamiento con otras especies del Género *Zea*.

Zea perennis tiene un número cromosómico de $2n=40$. Inicialmente Longley (1924) publicó que todos los cromosomas eran bivalentes, pero posteriormente indicó (Longley, 1934) que se trataba de un caso excepcional, ya que *Euchlaena perennis* (*Zea perennis*) era un autotetraploide con 10IV.

En el recuento cromosómico de plantas obtenidas a partir de semillas de un clon introducido desde México al Instituto Fitotécnico de Santa Catalina en 1962, se hallaron diferentes configuraciones meióticas, siendo las más frecuentes 10II+5IV (54,47%) y 12II+4IV (20,74%) (Tabla 14, Fig.11). Los bivalentes eran preferentemente abiertos y los tetravalentes cerrados, con un bajo número de univalentes y trivalentes. El promedio de quiasmas por célula fue 34,56 (15,69 los bivalentes y 18,87 los tetravalentes).

En el 87,50% de las células analizadas en anafase I, migraron 20 cromosomas a cada uno de los polos, mientras que en el 12,50% restante migraron 19 cromosomas a un polo y 21 al otro. Solo excepcionalmente se ha observado un puente de inversión.

En el recuento de 1000 tetradas se observó que un 85,60% eran normales, 1,80% anormales, 7,80% de triadas y 4,80% de pentadas. Las tetradas y los granos de polen de *Z. perennis* eran más pequeños

que en el resto de las especies del complejo *Zea*, teniendo, para ser una especie estable, un elevado número de tetradas anormales (14,40%), siendo esto una posible causa de la disminución de la fertilidad del polen (89-92%) y de la semilla (70%).

2.2 Híbridos

2.2.1 Dihíbridos

2.2.1.1 Dihíbridos con $2n=20$

***Zea mays* spp *mays* por *Zea mays* spp *mexicana* (ZmxZmex).**

Zea mays variedad 'Colorado Klein' y *Zea mexicana* se cruzaron con gran facilidad, teniendo el híbrido un número cromosómico de $2n=20$ (Fig. 12A). El ciclo vegetativo del híbrido era anual, con rizomas cortos y definidos. Las plantas tenían 2,5 a 3 m de altura, gran vigor híbrido, con un promedio de 12 macollos por planta (un mínimo de 8 y un máximo de 20), muy prolíficas (10 a 12 espigas por tallo), estando la floración influenciada por el fotoperíodo (florece con menos de 13 h luz).

La flor masculina era una panoja apical con 8-12 ramificaciones secundarias, las flores femeninas eran espigas de 10-14 cm. de largo con 10 a 15 granos dispuestos en dos hileras que habitualmente se desprendían y caían a la madurez, aunque ocasionalmente los cariopses permanecían unidos al madurarse la espiga. La fertilidad del polen era de un 99% y la de las semillas del 98 al 100%.

Tras el estudio citogenético de 130 células en diacinesis-metafase I, se observó que el 90,77% de las mismas presentaba una configuración meiótica de 10II (Tabla 15, Fig. 13A) y el 9,23% restante 9II+2I (Fig.

13B), siendo los bivalentes cerrados (promedio de 9,35) y 16,12 quiasmas por célula. En el 70% de las células se observaba una fuerte asociación secundaria o separación espacial de los cromosomas en dos grupos de 5 cromosomas cada uno.

Del análisis de las células en paquiteno se dedujo que los cromosomas de ambas especies se apareaban en su totalidad debido a que los bivalentes estaban constituidos por un cromosoma de maíz (sin *knob* o con un *knob* subterminal) y un cromosoma de *Zea mexicana* (con *knob* terminal). En todos los casos se incrementó notoriamente el tamaño de los *knobs*, especialmente los terminales de *Zea mexicana*. Las anafases eran normales migrando 10 cromosomas a cada uno de los polos (Fig. 13C) y solo excepcionalmente se observaron cromosomas retrasados o puentes de inversión (Fig. 13D)

***Zea mays* spp *mays* por *Zea luxurians* (ZmxZI).**

El híbrido entre *Zea mays* spp *mays* por *Zea luxurians* tenía un número cromosómico de $2n=20$ (Fig. 12B), era anual, macollador (10 a 30 macollos), alcanzando de 2 a 3 m de altura, con rizomas cortos y definidos, y muy prolífico (5 a 8 espigas por tallo). Las espigas estaban constituidas por cariopses que en la mayoría de los casos se desprendían y caían a la madurez. La floración estaba influida por el fotoperíodo, floreciendo con día corto (menos de 13 h luz). Si durante el período de floración se daban condiciones ambientales desfavorables (temperaturas muy altas o sequía) se inducía, al igual que en otros híbridos de *Zea*, clorantía⁴ en la panoja.

⁴ Clorantia: desarrollo apomítico de plántulas en la panoja en lugar de las anteras. Si estas plántulas se las coloca en arena o tierra emiten raíces dando lugar a una nueva planta, con una constitución genética idéntica a la planta madre.

Del estudio citogenético en diacinesis-metafase I del híbrido ZmxZI, se dedujo que el promedio de apareamiento es de 0,99I+9,50II (Tabla 16), siendo la configuración meiótica más frecuente 10II (63,48% de las células). Se observaron cromosomas univalentes con baja frecuencia, aunque en mayor número que en otros híbridos del complejo *Zea*, teniendo un promedio de 15,48 quiasmas por célula. En anafase I migraron 10 cromosomas a cada uno de los polos en el 90% de las células, mientras que en el 10% restante quedaron cromosomas retrasados o se formaba un puente de inversión. La fertilidad del polen era del 92% y el de la semilla del 89%.

***Zea mays* spp *mays* por *Zea diploperennis* (ZmxZd20).**

El híbrido entre *Zea mays* y *Zea diploperennis* (Fig. 12C), cuyo número cromosómico era de $2n=20$ (Fig. 14A), tenía excelentes características forrajeras y un extraordinario crecimiento aéreo, alcanzando un desarrollo muy superior al de sus padres. El híbrido era macollador, con un promedio de 25 macollos por planta, teniendo un máximo de 40 y un mínimo de 8, aunque este carácter estaba muy influenciado por el ambiente (época de siembra, temperatura, densidad de siembra, labores culturales, etc.). Tenía una alta fertilidad y era muy prolífico (3 a 8 espigas fértiles por tallo), con buen rebrote después de un corte.

El ciclo vegetativo se extendió desde octubre hasta las primeras heladas de abril-mayo. El crecimiento vegetativo al comienzo fue muy lento, desarrollando un abundante sistema radicular que posteriormente le permitió aprovechar al máximo el agua disponible en el suelo otorgándole cierto grado de tolerancia a sequía. Desde diciembre hasta fines de marzo-abril (cuando comenzaba la floración) se producía el máximo de crecimiento aéreo; posteriormente tenía un crecimiento

vegetativo muy lento, debido a que la mayor parte de la energía de la planta era utilizada para la floración y formación de semillas.

Tal y como sucede en *Z. diploperennis*, la floración en el híbrido estuvo influenciada por el fotoperíodo, floreciendo cuando el día tenía entre 13 a 14 h luz.

Las plantas F1 del híbrido ZmxZd20 fueron un 75% anuales, 13% bianuales y el 12% restantes perennes (considerando que una planta es perenne cuando rebrota como mínimo tres años consecutivos en condiciones de campo).

La F1 fue atacada moderadamente por el barrenador del tallo (*Diatraea saccharalis*) y el carbón del maíz (*Ustilago maydis*), siendo tolerante a otras enfermedades sobre todo las producidas por virus, como por ejemplo el enanismo clorótico, mosaico, manchas cloróticas y el rallado del maíz.

Desde el punto de vista citogenético el híbrido tenía una meiosis regular. En el recuento de 181 células en diacinesis-metafase I (Tabla 17) se observó que el 69,06% de las células tenían una configuración meiótica de 10II (Fig. 14B); el 24,31% tenían 9II+2I; el 6,08% 8II+4I y el 0,55% 7II+6I, con un promedio de 0,76I+9,62II y 15 quiasmas por célula, siendo estos resultados similares a los observados en *Zea diploperennis*.

En anafase I se observó que en el 58,50% de las células analizadas migraban 10 cromosomas a cada uno de los polos (Fig. 14C); en el 27%, 9 -11 cromosomas; en el 9,75% quedaba un cromosoma retrasado; en el 7,32% habían dos cromosomas retrasados o se

formaba un puente de inversión (Fig. 14D); y en el 2,45% restante se observaron de 2 o 3 puentes de inversión.

En paquiteno los cromosomas de las dos especies se aparearon en su totalidad y solo en casos excepcionales se observó apareamiento parcial o falta de apareamiento. En el brazo largo del cromosoma 5, próximo al centrómero, se halló una inversión paracéntrica, pero sólo un 9% de las células en anafase I presentaron un puente de inversión, lo que indicaría que se produjeron pocos sobrecruzamientos dentro de la inversión.

Una inversión similar ha sido descrita por Pasapuleti y Galinat (1982) en híbridos de *Z. mays* WMT por *Z. diploperennis*, no hallándose en nuestros materiales la inversión terminal del cromosoma 9 referida por los autores antes mencionados.

En la F1 del híbrido se podía observar en los cromosoma bivalentes los *knobs* subterminales característicos de *Z. mays* y los terminales de *Z. diploperennis*, habiéndose incrementado notoriamente su tamaño, sobre todo los *knobs* terminales de *Z. diploperennis*.

Analizando los datos citogenéticos del híbrido se pudo deducir que existe una elevada homología cromosómica entre las dos especies, lo que se tradujo en una elevada fertilidad del polen (92-95%) y de la semilla (90%).

***Zea diploperennis* por *Zea luxurians* (ZdxZI).**

Del cruzamiento entre *Zea diploperennis* con *Zea luxurians* (Fig. 12D), ambas con $2n=20$, se obtuvo el híbrido *Zea diploperennis* por *Zea luxurians* que también tenía un número cromosómico de $2n=20$. Las

plantas fueron bianuales o perennes, fértiles, macolladoras (15 a 30 tallos por planta), con una altura de 2 a 3 m, con rizomas cortos y prolíficas (8 a 10 espigas por tallo). Las plantas del híbrido florecían, al igual que las de las especies parentales, cuando el día alcanzaba menos de 13 h luz. Las semillas estaban encerradas en cúpulas que se desprendían y dispersaban a la madurez, de manera similar a lo que ocurre en sus progenitores.

Los estudios citogenéticos en diacinesis-metafase I mostraron un promedio de apareamiento cromosómico de $0,37I+9,61II+0,09IV$ (Tabla 18), siendo la configuración meiótica más frecuente $10II$ (75,50% de las células) y un promedio de 15,26 quiasmas por célula.

Los bivalentes resultaron del apareamiento de los cromosomas de *Z. diploperennis* con *Z. luxurians*. Tres de los bivalentes mostraron apareamiento entre cromosomas de diferente longitud, siendo aparentemente más largos los de *Z. luxurians* que los de *Z. diploperennis*. A diferencia de los híbridos antes comentados, el híbrido $ZdxZI$ mostró apareamiento entre dos bivalentes, formándose con baja frecuencia un tetravalente.

Las anafases fueron regulares y sólo excepcionalmente se observaron uno o dos puentes de inversión, cromosomas retrasados o distinto número cromosómico en cada uno de los polos. La fertilidad del polen era del 94% y la viabilidad de las semillas del 90%.

2.2.1.2 Dihíbridos con $2n=20$ y 30

***Zea mays* spp *mays* ($2n=20$) por *Zea mays* spp *parviglumis* con $2n=20$ (ZmxZpar20) y *Zea mays* spp *mays* ($2n=40$) por *Zea mays* spp *parviglumis* con $2n=30$ (ZmxZpar30).**

El híbrido *Zea mays* spp *mays* ($2n=20$) por *Zea mays* spp *parviglumis* con $2n=20$, se obtuvo cruzando el cultivar Colorado Klein, o las líneas de maíz A188, B73 y SC66, con $2n=20$ (Fig. 15A), por *Z. parviglumis* con el mismo número cromosómico (Fig. 15C). El híbrido tiene un número cromosómico de $2n=20$ y era anual. La planta alcanzaba 3 o más metros de altura, tenía pocos macollos (promedio de 2 macollos por planta), la floración era continua en el internodo y prolífica (una espiga en cada uno de los entrenudos del tallo). Las espigas tenían de 6 a 8 semillas encerradas en cápsulas que se desarticulaban y caían a la madurez. La fertilidad del polen era del 96% y el de las semillas del 90%.

En condiciones ambientales desfavorables para el desarrollo del híbrido (fundamentalmente baja irradiación y altas temperaturas) se producía clorantia.

Del estudio meiótico en diacinesis-metafase I se dedujo que la configuración meiótica más frecuente era de 10II (74,27%) con una baja frecuencia de univalentes y trivalentes (Tabla 19, Fig. 15D), teniendo un promedio de 0,23I+9,56II+0,05III+0,15IV y 15,42 quiasmas por célula. En un 17% de las células se observó un tetravalente, producto del apareamiento de dos pares cromosómicos homeólogos de diferente tamaño (Tabla 19 Fig.15E). En el 45% de las células analizadas, se observó asociación secundaria o separación en dos grupos de 5

cromosomas cada uno. En el 90% de los casos las anafases eran normales, migrando 10 cromosomas a cada uno de los polos, y en el 10% restante se observaron cromosomas retrasados (Fig. 15F) así como 1 o 2 puentes de inversión (Fig. 15G). La fertilidad del polen era del 95% y el de la semilla del 90%

El híbrido *Zea mays* spp *mays* ($2n=40$) por *Zea mays* spp *parviglumis* con $2n=30$, se obtuvo cruzando las líneas de maíz N107B, N104B y N103A, con $2n=40$ (Fig. 15B), provenientes del Maize Cooperation Stock Center (Urbana, Illinois) con *Z. parviglumis*. El híbrido solo se obtuvo mediante el rescate *in vitro* del embrión, debido a que no se obtenían semillas viables *in vivo*. El medio de cultivo utilizado fue el de García *et al.*, 1992, suplementado con 2,4-D más kinetina (tabla 1 anexo)

El híbrido ZmxZpar30 tenía un número cromosómico de $2n=30$. Las plantas alcanzaron unos 2 m de altura, teniendo de 6 a 8 macollos por planta, eran prolíficas con una o dos espigas por entrenudo. A diferencia del híbrido con $2n=20$, las espigas del híbrido con $2n=30$ tenían el raquis rígido estando dispuestos los granos desnudos en 2 a 4 hileras. En algunos casos se desarrollaba en el mismo nudo reproductivo la espiga y la panoja juntas. La floración estaba influenciada por el fotoperíodo floreciendo con 13 h luz. La fertilidad del grano de polen era de un 40-80%, obteniéndose un 15% de semilla fértil.

Del estudio citogenético en diacinesis-metafase I se pudo deducir que las configuraciones meióticas más frecuentes eran 5III+5II+5I (29,68%) y 4III+6II+6I (20,31%), con un promedio por célula de 4,05III+5,93II+5,97I (Tabla 20, Fig. 15H), siendo el promedio de quiasmas por célula de 25,60. Las anafases eran anormales, migrando

distinto número cromosómico a cada uno de los polos (Fig. 15I), o quedaban cromosomas retrasados dando lugar a células desbalanceadas cromosómicamente. La fertilidad del polen variaba entre 40 y 80%, pero sólo se obtuvo un 15% de semilla viable.

2.2.1.3 Dihíbridos con $2n = 30$

***Zea mays* spp *mays* ($2n=40$) por *Zea mays* spp *mays* ($2n=20$), (ZmxZm30).**

Los híbridos, entre maíces de diferente nivel de ploidía, solo se obtuvieron cuando se rescataron y cultivaron *in vitro* los embriones inmaduros.

Para lograr el híbrido se cruzaron las líneas parentales N107B, N104B y N103A con $2n=40$ y Colorado Klein con $2n=20$. Los cariopses cosechados entre 12 a 15 días después de la polinización (DDP). mostraron un desarrollo normal del endosperma midiendo los embriones entre 0,6 y 1,5 mm. Los cariopses cosechados a los 17 DDP, tenían un endosperma muy escaso, midiendo los embriones entre 1,5 y 2,3 mm. En los cariopses cosechados con posterioridad a esta fecha se había atrofiado el endosperma, lo cual había provocado la muerte del embrión.

Mediante el rescate de los embriones entre 12 y 17 días después de la polinización y su colocación en un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, se logro la germinación del 100% de los embriones sembrados (125) a los 7 días de incubación. A los 20 días de la siembra las plantas cultivadas *in vitro* tenían hojas muy finas, levemente enroscada y muy pocas raíces adventicias. A los 30 - 40 días después de la siembra las plantas se aclimataron *in vivo* y cultivaron en macetas sobreviviendo solamente un 8% de las mismas. La floración de estas

últimas se producía entre 90 y 160 días desde la siembra de los embriones.

El híbrido tenía un número cromosómico de $2n=30$, no difiriendo fenotípicamente de un maíz con $2n=20$. Del análisis citogenético del mismo se determinó que en aproximadamente el 10% de las células analizadas en diacinesis-metafase I los cromosomas se encontraban apareados formando 10III (Fig. 16A), mientras que en el resto de las células se observaron diferentes proporciones de I, II o III (tabla 21, Fig. 15B, 15C), siendo la configuración meiótica más frecuente de 8III+2II+2I con un promedio de 2,35I+2,35II+7,15III (Tabla 21).

En paquiteno se observaron dos cromosomas organizadores del nucleolo, teniendo en algunos casos las células dos o más nucleolos que persistían en metafase I y anafase I, al igual que numerosos nucleolitos (Fig.16D). En el 40% de las células en anafase I migraron 15 cromosomas a cada uno de los polos, mientras que en el 60% restante migraba distinto número de cromosomas a cada uno de los polos, pero no se observaron cromosomas retrasados, puentes de inversión, ni micronúcleos al final de la división meiótica. La fertilidad del polen oscilo entre 11 y 55%, pero no se obtuvieron semillas fértiles.

***Zea perennis* por *Zea mays* ssp. *mexicana* con $2n=30$.**

El híbrido entre *Zea perennis* por *Zea mexicana* (ZpxZmex) se consiguió con mucha dificultad, obteniéndose solamente 5 semillas capaces de germinar y dar plantas que tenían un número cromosómico de $2n=30$.

Las plantas eran perennes, muy vigorosas, macolladoras (8 a 40 macollos), de gran porte (2,5 a 3,5 m. de altura), con rizomas cortos y definidos, y prolíficas (con una o más espigas en cada uno de los

entrenudos del tallo). Las espigas eran dísticas con 6 a 10 cariopses. Las plantas florecían, al igual que sus progenitores, con fotoperíodo de día corto (menos de 13 h luz). La fertilidad del polen variaba entre 15 y 36%, pero solo se obtuvo un 2% de semilla fértil.

Cuando el híbrido estuvo sometido a condiciones de estrés como por ejemplo altas temperaturas o sequía, se producía clorantia en la panoja, cuando se eliminaban esos factores de estrés producía polen normal.

Del estudio citogenético en diacinesis-metafase I del híbrido (Tabla 22) se dedujo que la configuración meiótica más frecuente era 5I+5II+5III con un promedio de 5,26I+5,50II+4,58III y una frecuencia de 24,02 quiasmas por célula. Solamente en el 2% de las células se observó un apareamiento de 6 o 7III. Al igual que en otros híbridos con $2n=30$, se observó asociación secundaria en el 45% de las células, separándose los cromosomas en tres grupos bien diferenciados de univalentes, bivalentes y trivalentes.

En un 5% de las células en anafase I migraron 15 cromosomas a cada uno de los polos. En el 95% restante la anafase era irregular con un alto porcentaje de cromosomas retrasados, lo que originaba un distinto número cromosómico en cada uno de los polos. Excepcionalmente, se observó uno o dos puentes de inversión. En la mayoría de los casos las tétradas eran anormales, lo que explicaría la baja fertilidad del polen y la formación de semillas estériles.

***Zea luxurians* por *Zea perennis* (ZlxZp).**

La obtención del híbrido entre *Zea luxurians* ($2n=20$) por *Zea perennis* ($2n=40$) fue muy dificultosa, habiéndose logrado solo unas pocas semillas fértiles. El híbrido ZlxZp tenía un número cromosómico de

$2n=30$, era perenne, y mostraba un exuberante desarrollo radicular, teniendo rizomas cortos y definidos. Las plantas eran macolladoras (20 a 50 macollos por planta), prolíficas (una o más espigas por nudo del tallo), de 2 a 2,5 m de altura, y florecían cuando la longitud del día era inferior a 13 h luz, al igual que ocurre en las especies parentales. La fertilidad del polen fue muy baja (5%), produciendo solamente un 1% de semilla fértil que se desprendía y caía a la madurez.

Del análisis de las configuraciones meióticas de 160 células en diacinesis-metafase I se dedujo que el promedio de apareamiento cromosómico era de $5,57I+5,02II+4,71III$ (Tabla 23), siendo las configuraciones meióticas más frecuentes $5I+5II+5III$ (27%) y $6I+6II+4III$ (20,90%), con un promedio de 24,87 quiasmas por célula. En un 60% de las células analizadas se observó asociación secundaria, estando los cromosomas separados espacialmente en 3 grupos, por un lado los trivalentes, por otro los bivalentes y finalmente los univalentes

A diferencia de otros híbridos de *Zea* con $2n=30$, en este se ha incrementado el porcentaje de apareamiento de los cromosomas homeólogos de las dos especies, observándose en un 30% de las células de 6 a 10 trivalentes.

En el 10% de las células analizadas en anafase I, migraron 15 cromosomas a cada polo; en el resto de las anafases se observó diferente número cromosómico en cada uno de los polos, quedando cromosomas retrasados o formándose uno o más puentes de inversión, dando como consecuencia gametos desequilibrados estériles, lo que explicaría la baja fertilidad del híbrido.

2.2.1.4 Dihíbridos con $2n = 30 - 40$

Híbridos entre *Zea mays* spp *mays* ($2n=20$) y *Zea perennis* con un número cromosómico de $2n=30$ (ZmxZp30) y entre *Zea mays* spp *mays* ($2n=40$) y *Zea perennis* con un número cromosómico de $2n=40$ (ZmxZp40)

La obtención del híbrido entre *Zea mays* variedad "Colorado Klein" con $2n=20$ (Fig. 20A) por *Zea perennis* con $2n=40$ (Fig. 20B) fue muy dificultosa debido a que a los 20-30 días después de la polinización se producía el colapso del endosperma del maíz y la posterior muerte del embrión. Como consecuencia, sólo se desarrollaron dos embriones que se rescataron y cultivaron *in vitro* a los 30 días después de la polinización, cuando habían alcanzado un tamaño de 0,5 mm. De esta forma, se logró el híbrido entre *Z. mays* y *Z. perennis* con un número cromosómico de $2n=30$ (ZmxZp30).

La obtención de los híbridos entre genotipos de maíz con $2n=40$ por *Z. perennis* dependía mucho del maíz utilizado, obteniéndose los mejores resultados con la línea N107C (Tabla 24).

El nivel de ploidía y el número de cromosomas aportados por cada uno de los padres influyó notablemente en las características fenotípicas de los híbridos (Tabla 25 y Fig.18A, B, C, D), apareciendo características que no tenían los progenitores, como la clorantía (Fig. 19)

De los estudios citogenéticos de ambos híbridos se ha determinado que las configuraciones meióticas más frecuentes en diacinesis-metafase I son las siguientes:

En el híbrido ZmxZp30 las configuraciones meióticas más frecuentes fueron 5III+5II+5I (53,57%) y 4III+6II+6II (25,71%), con un promedio por célula de 5,07I+5,39II+4,71III (Tabla 26, Fig. 20C). Sólo en el 6% de las células se observaron más de 5III, con un promedio de 23,06 quiasmas por célula, siendo la fertilidad del polen del 12% y el de la semilla del 2%.

Los trivalentes del híbrido entre *Z. mays* con *Z. perennis* con $2n=30$ se formarían al aparearse dos cromosomas homeólogos de *Zea perennis* con uno de *Zea mays*, los bivalentes por el apareamiento de dos cromosomas homeólogo de *Zea perennis*, quedando como univalentes los cromosomas de *Zea mays*.

Las configuraciones meióticas más frecuentes del híbrido con $2n=40$ entre *Z. mays* con *Z. perennis* (ZmxZp40) fueron 5IV+10II y 4IV+12II (Tabla 25, Fig. 20D), con un promedio por célula de 4,12IV+11,62II, habiéndose observado solamente en un 1% de las células más de 5IV (Tabla 25). El promedio de quiasmas por célula fue de 33,59, teniendo una alta fertilidad tanto el polen (50-90%) como de la semilla (60-80%). Las anafases eran regulares, migrando 20 cromosomas a cada uno de los polos y solo excepcionalmente quedaron cromosomas retrasados.

En el híbrido entre *Z. mays* x *Z. perennis* con $2n=40$ los tetravalentes observados serían el producto del apareamiento de dos de los cromosomas homeólogos de cada una de las especies, mientras que los bivalentes serían por un lado los cromosomas homólogos de *Z. mays* (BmBm) y por el otro el apareamiento homeólogo de los genomas Bp₁ y Bp₂ de los cromosomas de *Z. perennis* (Fig. 33).

***Zea diploperennis* por *Zea perennis* con $2n=30$ - 40.**

Los primeros cruzamientos entre *Zea perennis* y *diploperennis* se realizaron en 1980 en el Instituto Fitotécnico de Santa Catalina teniendo un comportamiento diferente en función de la especie que se utilizaba como progenitor femenino. Cuando el progenitor femenino era *Zea perennis* no se obtuvo ninguna semilla fértil, aunque posteriormente se lograron plantas de este cruzamiento rescatando los embriones *in vitro* entre 20 y 30 días después de la polinización. En cambio, en el cruzamiento recíproco, utilizando como progenitor femenino a *Zea diploperennis*, se obtuvo un 60% de semillas fértiles, las cuales en el 90% de los casos desarrollaron plantas que tenían un número cromosómico de $2n=30$.

La F1 del híbrido entre *Zea diploperennis* y *Zea perennis* con $2n=30$ ($ZdxZp30$) era perenne, vigorosa, con abundante desarrollo aéreo (45 tallos por planta por término medio), con rizomas cortos (lo que favorecía su propagación), y muy prolífico (entre 6 a 8 espigas por tallo). La inflorescencia femenina tenía el raquis frágil lo que favorecía el desprendimiento y dispersión de las semillas.

Del estudio citogenético del híbrido se dedujo que la configuración meiótica más frecuente era de $5III+5II+5I$ (Tabla 28) con un promedio de 17,25 quiasmas por célula. En paquiteno se observaron translocaciones e inversiones. En la mayoría de las células en anafase I, quedaban cromosomas retrasados y uno o más puentes de inversión. Sólo con baja frecuencia migraron 15 cromosomas a cada uno de los polos. La fertilidad del polen variaba desde el 37 al 83%, pero solamente se obtuvo un 2% de semilla viable.

Entre todas las F1 del híbrido *Zea diploperennis* y *Zea perennis* se destacó una planta que tenía una elevada fertilidad (80% de granos fértiles) y que morfológicamente era más parecida a *Zea diploperennis*.

Del estudio citogenético realizado en esta planta, se determinó que tenía un número cromosómico de $2n=40$ (Fig. 21A), llegando a la conclusión de que este híbrido excepcional sería el producto del cruzamiento entre un gameto no reducido de *Z. diploperennis* por un gameto normal de *Z. perennis*.

Del análisis citogenético de 214 células en diacinesis-metafase I se obtuvo un promedio de apareamiento cromosómico de $0,24I+11,29II+0,06III+4,20IV$, siendo la configuración meiótica más frecuente $10II+5IV$ (Tabla 29, Fig. 21B). El híbrido tuvo un bajo porcentaje de uni y trivalentes, apareándose la mayoría de los cromosomas como bi o tetravalentes preferentemente abiertos, con un promedio de 31,42 quiasmas por célula distribuidos de la siguiente manera: 15,96 en los bivalentes, 0,10 en los trivalentes y 15,36 en los tetravalentes.

En células en paquiteno del híbrido era muy difícil identificar o distinguir los cromosomas de cada una de las especies, debido a que ambas poseen cromosomas con *knobs* terminales pequeños. Solamente pudo identificarse un cromosoma de *Z. diploperennis* fácilmente porque tenía un *knob* terminal grande.

En el 78% de las células en anafase I migraron 20 cromosomas a cada uno de los polos y en el 22% restante se producía la migración de un distinto número cromosómico, quedando cromosomas retrasados y

apareciendo de forma excepcional un puente de inversión. La fertilidad del polen fue del 56%, con un porcentaje de semillas fértiles del 80%

2.2.1.5 Dihíbridos con $2n=40$

***Zea mays* spp *parviglumis* por *Zea diploperennis* con $2n=40$, obtenido por duplicación cromosómica del híbrido (ZparxZd20).**

Del cruzamiento entre las especies *Z. parviglumis* x *Z. diploperennis*, ambas con $2n=20$, se obtuvo un híbrido excepcional, producto de la duplicación cromosómica de este híbrido (ZparxZd20), resultando uno nuevo con $2n=40$ (ZparxZd40).

El híbrido entre *Zea parviglumis* x *Zea diploperennis* con $2n=40$ (ZparxZd40) era bianual, fértil (95% de fertilidad del polen y 90% de viabilidad de las semillas), macollador, de 2 a 3 m de altura, con rizomas cortos, prolífico (con varias espigas por tallo), y florecía con días cortos (Fig. 22). Las semillas estaban encerradas en cúpulas con raquis frágil que se desprendían y caían a la madurez, de manera similar a lo que ocurría con sus progenitores.

Del estudio citogenético del híbrido se dedujo que tenía una gran dispersión en las configuraciones meióticas (Tabla 28, Fig. 23a y b), siendo las más frecuentes 16II+2IV y 18II+1IV, con un promedio de 1,18I+15,27II+0,07III+2,02IV (Tabla 30) y 28,20 quiasmas por célula.

Los tetravalentes eran el producto del apareamiento de los cromosomas de *Z. parviglumis* con *Z. diploperennis*; en cambio los bivalentes serían el resultado del apareamiento de los cromosomas homólogos de la misma especie ya que no se ha observado apareamiento entre cromosomas de distinta longitud, cosa que sí ocurría en el híbrido entre

las mismas especies con $2n=20$. Las anafases fueron regulares (Fig. 23c) y sólo excepcionalmente se observaron uno o dos puentes de inversión, cromosomas retrasados (Fig. 23d) o distinto número cromosómico en cada uno de los polos. La fertilidad del polen fue del 70% y el de las semillas de un 60%

En el 20 % de las células en distintos estadios de la división meiótica del híbrido se observó que los citoplasmas de dos o más células permanecían unidos a lo largo de la división celular, produciéndose intercambio de material genético y variación en el número cromosómico (Fig. 23e-f), pudiendo ser éste uno de los posibles mecanismos de duplicación cromosómica del híbrido y la obtención de híbridos de *Zea* con distinto nivel de ploidía.

2.2.2 Trihíbridos

2.2.2.1 Trihíbrido con $2n=20$

Híbrido entre *Zea mays*, *Zea diploperennis* y *Zea luxurians* (MDL).

El híbrido entre *Zea mays* variedad "Colorado Klein" por *Zea diploperennis* (Fig. 24A), se cruzó con *Zea luxurians* obteniéndose el trihíbrido (MDL), con un número cromosómico de $2n=20$ (Fig. 24B).

El trihíbrido MDL tenía una altura de 3,0 a 3,3 m., era fértil (90% de semillas viables), macollador, prolífico (una o más espigas por entrenudo y entre 10 o 12 por tallo), con raíces abundante en cabellera y con rizomas cortos, muy tolerante a sequía y enfermedades. Las semillas se encontraban encerradas en cúpulas que se desprendían y caían a la madurez (Fig. 24A y B). La planta florecía con fotoperíodo de día corto, siendo la floración continua al igual que ocurre en las especies parentales silvestres.

El trihíbrido comenzó a panojar, independientemente de su desarrollo fenológico, cuando se daban las condiciones de fotoperíodo requerido. Si durante esa etapa, se lo exponía a condiciones ambientales estresantes, como por ejemplo altas temperaturas o baja humedad relativa o, alternativamente a un fotoperíodo de día largo, se producía clorantia en la panoja (Fig. 25A), dando lugar a la formación de plántulas en lugar de las anteras (Fig. 25B). Si estas plántulas se colocaban en agua o arena húmeda emitían raíces obteniéndose una descendencia con la misma constitución genética de la planta madre (Fig. 25C y D).

De la comparación de las configuraciones meióticas del trihíbrido y sus progenitores (*Zea mays*, *Z. diploperennis*, el híbrido entre ambas especies, *Z. luxurians* y el trihíbrido MDL), se dedujo que eran regulares, siendo la configuración meiótica más frecuente 10II (Tabla 33) teniendo, a excepción del maíz, todos una baja frecuencia de univalentes (Tabla 33).

En el trihíbrido entre *Z. mays*, *Z. diploperennis* y *Z. luxurians* (MDL), los cromosomas de maíz se aparearon con alguno de los cromosomas de las especies silvestres que constituyen el trihíbrido, debido a que los bivalentes estaban constituidos por un cromosoma con *knob* subterminal, típico de maíz, con otro cromosoma con *knob* terminal, típico de las especies silvestres. Al igual de lo que ocurre en otros híbridos se producía un notable incremento del tamaño de los *knobs*, en especial los terminales de las especies silvestres que prácticamente duplicaban su tamaño.

La longitud y la relación entre los brazos de los cromosomas de *Z. mays*, *Z. diploperennis* y *Z. luxurians* (tablas 5 y 6) son levemente diferentes en algunos casos, mientras que en otros hay diferencias significativas ya sea en el tamaño o en la relación entre los brazos. Sin embargo, en el híbrido solo se observaron tres pares de cromosomas apareados con distinto tamaño (Fig. 26A). Esto indicaría que durante la etapa de apareamiento cromosómico se minimizarían las diferencias relativas entre los cromosomas de las distintas especies, permitiendo de esa manera el apareamiento gen con gen en los cromosomas homeólogos.

Del estudio citogenético del trihíbrido entre *Z. mays*, *Z. diploperennis* y *Z. luxurians* (MDL), se determinó que el promedio del apareamiento cromosómico era de $0,78I+9,54II+0,02IV$, siendo la configuración meiótica más frecuente de $10II$ (Tabla 31, Fig. 26A), observándose con una baja frecuencia la presencia de univalentes y tetravalentes (Tabla 31, Fig. 26B) o de células con duplicación cromosómica (Fig. 26D). En el 42% de las células, los cromosomas mostraron asociación secundaria (Fig. 26C), teniendo un promedio de 14,57 quiasmas por célula. La fertilidad del polen variaba entre 60-80% y la de las semillas era del 72%.

Las anafases eran regulares y solo excepcionalmente se observó un puente de inversión (Fig. 26E), cromosomas retrasados (Fig. 26F) o distinto número de cromosomas en cada uno de los polos.

2.2.2.2 Trihíbrido con $2n=40$

Trihíbridos MDP producto del cruzamiento entre *Zea mays* spp *mays* $2n=40$ por el híbrido entre *Zea diploperennis* por *Zea perennis* con $2n=40$ y su recíproco.

Los trihíbridos MDP son el resultado del cruzamiento entre *Zea mays* con $2n=40$ con el híbrido excepcional entre *Zea diploperennis* x *Zea perennis* con $2n=40$ y su recíproco, dando híbridos con un número cromosómico de $2n=40$.

Los trihíbrido se obtuvieron con mucha facilidad y mostraban una elevada viabilidad de las semillas (90%), siendo inclusive superior a la de sus progenitores (60% en el maíz con $2n=40$ y 80% en el híbrido entre *Zea diploperennis* x *Zea perennis* con $2n=40$).

Los trihíbridos MDP eran anuales, alcanzando de 2 a 2,50 m de altura, desarrollando de 4 a 10 macollos fértiles por planta y tenían entre 8 a 10 nudos reproductivos con 1 o 2 espigas por nudo. El tipo de espiga del trihíbrido MDP variaba de acuerdo a la especie que se utilizaba como progenitor femenino. La espiga era dística con 4 a 8 hileras si el progenitor femenino era el maíz; en cambio, si el progenitor femenino era el híbrido entre *Zea diploperennis* x *Zea perennis* con $2n=40$ las semillas estaban encerradas en cariopses similares a los Teosintes. En ambos casos las semillas no se desprendían ni caían a la madurez como ocurría con los Teosintes. De acuerdo con estos resultados, en estos híbridos la forma de la espiga estaría influenciada por el citoplasma. La floración no estaba influenciada por el fotoperíodo y era continua cuando se cultivaba en invernáculo.

Del estudio citogenético de los trihíbridos MDP se pudo deducir que prácticamente no presentaron univalentes ni trivalentes, teniendo un promedio de apareamiento cromosómico en diacinesis-metafase I de $0,04I+10,91II+0,01III+4,50IV$ (Tabla 32), siendo la configuración meiótica más frecuente de $10II+5IV$ (43,93% de las células), con un promedio de 33,81 quiasmas por célula (17,33 en bivalentes y 16,45 en tetravalentes).

En el 92% de las células la anafase I era regular, habiéndose observado en el 8% restante uno o más puentes de inversión o cromosomas retrasados.

3 Comportamiento meiótico de las especies e híbridos del Género *Zea* de acuerdo a su nivel de ploídía

Agrupando las especies e híbridos del Género *Zea* en función de su nivel de ploidía (tabla 33), se pudo inferir lo siguiente:

- En general, las especies e híbridos con un mismo nivel de ploidía tienen configuraciones meióticas, número de quiasmas, fertilidad del polen y viabilidad de las semillas similares. No obstante hay tres excepciones, el maíz con $2n=40$ ($Zm40$) y los híbridos entre los maíces con distinto nivel de ploídía ($ZmxZm30$) y en el híbrido excepcional producto de la duplicación cromosómica entre *Z. parviglumis* y *Z. diploperennis* ($ZparxZd40$), que muestran una configuración meiótica diferentes con respecto al grupo al que pertenecen.
- Entre el grupo de especies con $2n=20$, *Zea mays* y *Zea mexicana* eran las más estables cromosómicamente y las que tenían mayor fertilidad.

- Los híbridos entre las distintas especies de *Zea* con $2n=20$, eran fértiles siendo muy difíciles de diferenciar de los teosintes tanto fenotípica como cromosómicamente.
- Solamente en el dihíbrido entre *Z. mays* por *Z. parviglumis* con $2n=20$ (ZmxZpar20) y en el trihíbrido entre *Z. mays*, *Z. diploperennis* y *Z. luxurians* (MDL) se observó con muy baja frecuencia un tetravalente, producto del apareamiento entre pares de cromosomas homeólogos.
- El trihíbrido con $2n=20$ (MDL), tuvo menor fertilidad del polen (60-80%) y de la semilla (72%) que los dihíbridos con el mismo nivel de plodía (Tabla 33).
- En los híbridos con $2n=30$, la configuración meiótica más frecuente fue 5III+5II+5I, con un promedio de apareamiento cromosómico de 5,46I+5,45II+4,50III. La excepción en este grupo fue el híbrido entre los maíces con distinto nivel de plodía (ZmxZm30), donde se han apareado los cromosomas homólogos entre si, produciéndose como consecuencia un elevado número de trivalentes, siendo la configuración meiótica más frecuente 2I+2II+8III, con un promedio de 2,65I+2,56II+7,41III.
- La fertilidad del polen en los híbridos osciló entre el 4% y el 83%; sin embargo la fertilidad (o viabilidad) de la semilla osciló entre 0 y 15%. Curiosamente, el híbrido más estéril y el más difícil de obtener fue el híbrido entre los maíces con distinto nivel de ploidía.
- En el grupo de las especies e híbridos con $2n=40$ se presentaron distintas situaciones, a saber:
 - a. *Zea mays* con $2n=40$, tiene un alto porcentaje de tetravalentes (8,34) y un bajo porcentaje de bivalentes

- (3,24). Es posible que este elevado número de tetravalentes se deba al apareamiento de los cromosomas homólogos de los genómos A y B del maíz.
- b. En el otro extremo se halla el híbrido excepcional producto de la duplicación cromosómica del híbrido entre *Z. parviglumis* y *Z. diploperennis* con $2n=40$ ($Z_{par} \times Z_{d40}$), donde es posible que se hayan apareado preferencialmente los cromosomas homólogos de cada una de las especies, produciéndose como consecuencia un alto porcentaje de bivalentes (15,27) y un muy bajo porcentaje de tetravalentes (2,02).
 - c. *Zea perennis* y el resto de los híbridos con $2n=40$ tenían configuraciones meióticas similares con un promedio de apareamiento de 11,21II y 4,43IV.
- Con respecto al ciclo de vida (anual, bianual o perenne), en término general las F1 con un número cromosómico de $2n=20$, eran anuales y solo excepcionalmente bianuales. En cambio, las F1 con $2n=30$, producto del cruzamiento entre las mismas especies con *Zea perennis*, eran perennes. Los híbridos con $2n=40$, tuvieron un comportamiento anual o, excepcionalmente, bianual. Aparentemente, en el complejo *Zea*, la perennidad estaría influenciada por dosis de genes que aportarían las distintas especies para este carácter, aunque para confirmar esto último se requiere de un estudio más profundo.

4 Efecto de la solución diluida de colchicina en el apareamiento críptico de los cromosomas del complejo *Zea*.

Con el objeto de dilucidar el apareamiento críptico de los cromosomas homeólogos de los distintos genomios de las especies e híbridos del complejo *Zea*, se trataron panojas inmaduras con solución diluida de colchicina ($0,5 \times 10^{-4}$ M), obteniéndose los siguientes resultados:

4.1 En especies de *Zea* con $2n=20$:

En *Z. mays* con $2n=20$ (Zm20), *Z. mexicana* (Zmex), *Z. parviglumis* (Zpar) y *Z. luxurians* (Zl) (Fig. 27), la colchicina hizo que se aparearan los cromosomas homeólogos de los genomios A y B (Fig. 33), observándose hasta un máximo de 5IV (Fig.27, 31A), no existiendo diferencias significativas de los resultados obtenidos entre las diferentes especies. La excepción en este grupo fue *Z. diploperennis* (Zd), donde no se indujo la formación de tetravalentes (IV), al menos con la dosis de colchicina que se utilizó y que había dado una respuesta favorable en todas las especies de *Zea* (Fig.27).

4.2 En híbridos de *Zea* con $2n=20$:

La respuesta al apareamiento críptico de los cromosomas de los genomios homeólogos A y B, en los híbridos con $2n=20$, varió según el cruzamiento analizado:

- En los híbridos entre *Z. mays* por *Z. mexicana* (ZmxZmex), *Z. mays* por *Z. parviglumis* con $2n=20$ (ZmxZpar20), *Z. mays* por *Z. luxurians* (ZmxZl) y en el trihíbrido entre *Z. mays*, *Z. diploperennis* y *Z. luxurians* (MDL), se indujo el apareamiento críptico de los cromosomas homeólogo de los genomios A y B de las distintas especies (Fig. 28), en proporciones que

variaron según el híbrido analizado. En el híbrido ZmxZpar20, se produjo el mayor apareamiento críptico entre los cromosomas homeólogos de los genomios A y B.

- Por otro lado, en los híbridos entre *Z. mays* por *Z. diploperennis* (ZmxZd) y *Z. diploperennis* por *Z. luxurians* (ZdxZI) no se indujo el apareamiento críptico entre los cromosomas homeólogos de los genomios A y B (Fig. 28). En ambos casos uno de los progenitores era *Z. diploperennis*, donde tampoco se había inducido el apareamiento críptico de los cromosomas homeólogos de los genomios A y B (Fig. 27).

4.3 En híbridos de Zea con 2n=30:

En este conjunto de híbridos se presentaron distintas situaciones:

- En el híbrido entre los maíces de distinto nivel de ploidía (ZmxZm30) prácticamente no habían diferencias significativas entre el material en el que se había realizado el tratamiento y el testigo (sin tratamiento). En ambos casos la configuración meiótica más frecuente fue de 8III+2II+2I (Fig. 29). Es posible que no se hallasen diferencias significativas entre ambos (material tratado y testigo), debido a que el híbrido procedía del cruzamiento de plantas de la misma especie con distinto nivel del ploídía. En este, caso los cromosomas homólogos tendieron a aparearse entre si, no produciéndose como consecuencia un apareamiento preferencial entre los cromosomas homeólogos de los genomios A y B del maíz.
- En los híbridos entre *Z. mays* por *Z. parviglumis* con 2n=30 (ZmxZpar30) y *Z. luxurians* por *Z. perennis* (ZlxZp) se incrementó de forma significativa el apareamiento críptico de los

cromosomas homeólogos dando un alto porcentaje de trivalentes (hasta un máximo de 10), en el material tratado con respecto al material sin tratar (Fig. 29). En forma excepcional, en el material testigo del cruzamiento entre *Z. luxurians* por *Z. perennis*, se había observado apareados los cromosomas homeólogos de las dos especies observándose hasta un máximo de 10III (Fig.23).

- En los híbridos entre *Z. perennis* por *Z. mexicana* ($Z_{px}Z_{mex}$) y *Z. diploperennis* por *Z. perennis* con $2n=30$ ($Z_{dx}Z_{p30}$), aumentó de forma significativa el apareamiento críptico entre los cromosomas homeólogos de las dos especies en el material tratado (Fig. 29). En el testigo (sin tratamiento), se había observado hasta un máximo de 6III, mientras que en el material tratado se observaron hasta 10III (Fig. 29).
- La mayor diferencia entre el material tratado y no tratado se dio en el híbrido entre *Z. mays* por *Z. perennis* con $2n=30$ ($Z_{mx}Z_{p30}$) (Tabla 29, Fig. 31C), mientras que en el testigo (sin tratamiento) la configuración meiótica más frecuente fue $5III+5II+5I$, en el material tratado era de $8III+2II+2I$. En este caso el apareamiento en los cromosomas homeólogos del genomio B se incrementó en forma altamente significativa.

4.4 En especies e híbridos con $2n=40$:

En este conjunto de especies e híbridos de *Zea* se dieron distintas situaciones, a saber:

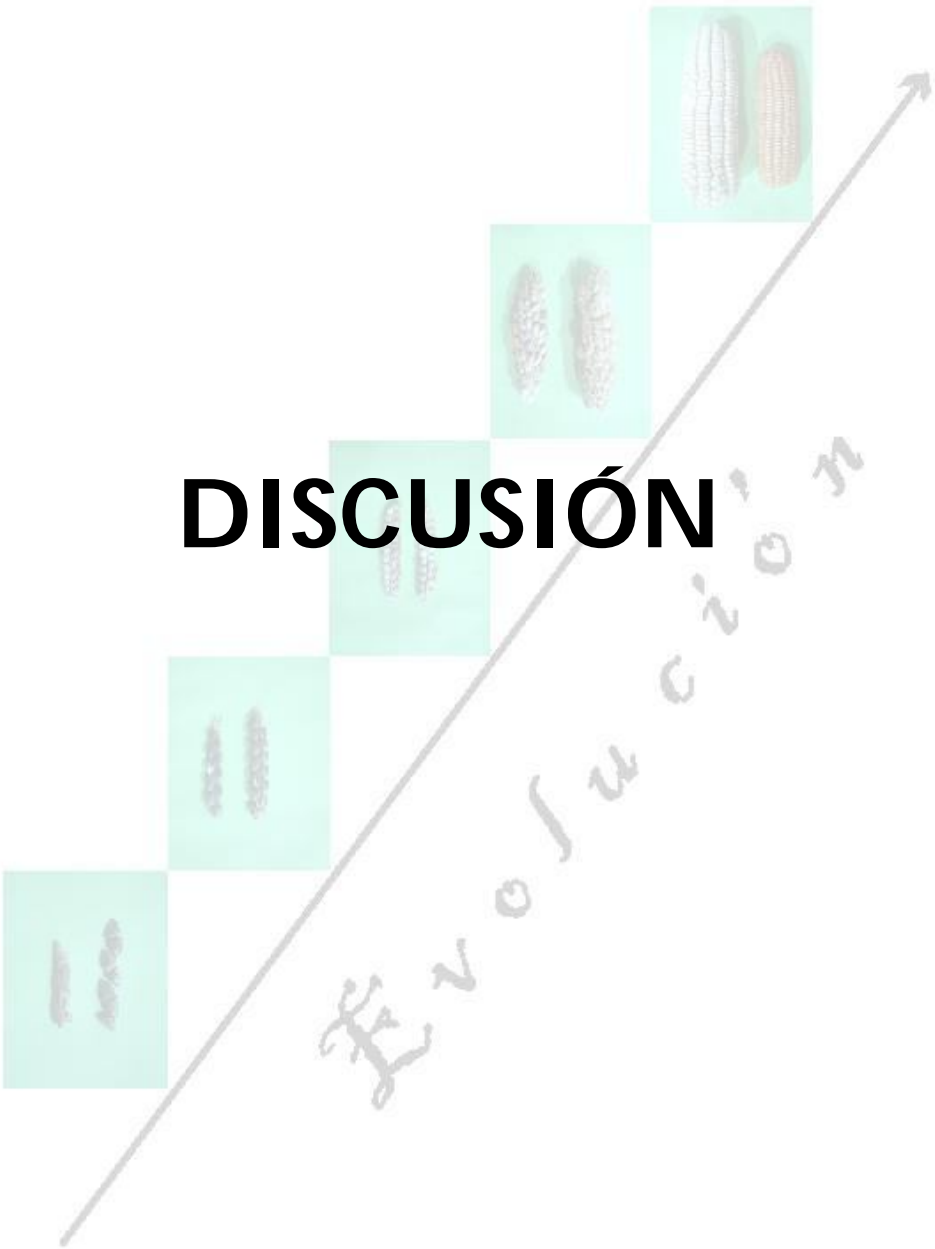
- En el maíz con $2n=40$ (Z_{m40}), no encontramos diferencias dignas de mención entre el material tratado y el testigo (Fig. 30), salvo por lo que se refiere a un pequeño incremento en las

configuraciones meióticas de 9IV+2II o 10IV y una leve disminución en las configuraciones con menos de 7IV.

- En *Z. perennis*, la configuración meiótica más frecuente en el material sin tratar era de 5IV+10II y, con muy baja frecuencia, se observaron 6IV+8II. En el material tratado con colchicina, aumentó el porcentaje de IV hasta un máximo 10, con un promedio de 7IV+6II (Fig. 30), lo que estaría indicando que se habría producido el apareamiento de los cromosomas homeólogos de los genomas Bp₁ y Bp₂ de *Z. perennis* (Fig. 31B).
- En los híbridos entre *Z. mays* por *Z. perennis* con 2n=40 (ZmxZp40) (Fig 31D), *Z. diploperennis* por *Z. perennis* con 2n=40 (ZdxZp40) y el trihíbrido entre *Z. mays*, *Z. diploperennis* y *Z. perennis* (MDP) aumentó de forma notoria la cantidad de IV en el material tratado con respecto al testigo, llegando hasta un máximo de 10IV (Fig. 30). En todos los casos, en el material sin tratar, se había observado, aunque en muy baja proporción, apareamiento entre los cromosomas homeólogos de las distintas especies, especialmente en los híbridos entre *Z. diploperennis* y *Z. perennis* (Fig.30)
- El híbrido entre *Z. parviglumis* con *Z. diploperennis* ZparxZd40, obtenido por la duplicación cromosómica del híbrido entre las mismas especies pero que había duplicado su número cromosómico (ZparxZd20), tiene un comportamiento totalmente diferente al resto de híbridos con el mismo número cromosómico. En el testigo la configuración meiótica más frecuente fue de 2IV+8II. Aparentemente en este híbrido se

habría privilegiado el apareamiento de los cromosomas idénticos en detrimento del apareamiento homeólogo del genomio A, lo que explicaría la baja frecuencia de IV. El material tratado con colchicina tuvo un comportamiento similar al resto de los híbridos (Fig. 30 y 32B).

- Con respecto a los quiasmas, en todos los casos aumentó su número en forma significativa, a excepción de las especies *Z. diploperennis* y el maíz con $2n=40$ ($Zm40$) y los híbridos entre *Z. mays* por *Z. diploperennis* ($ZmxZd$) y *Z. diploperennis* por *Z. luxurians* ($ZdxZl40$) con $2n=40$. En estas especies e híbridos, la colchicina tampoco había inducido el apareamiento críptico entre los cromosomas homeólogos de los genomios A y B.



1 Longitud, relación entre los brazos y posición de los knobs en los cromosomas del género *Zea*.

Comparando la longitud relativa, relación entre los brazos y posición de los *knobs* de los cromosomas de las especies del Género *Zea* (Tablas 5, 6, 7 y Figuras 5 y 6), se pudo inferir lo siguiente:

- Las longitudes relativas de los cromosomas de las especies de *Zea* con $2n=20$ (tabla 5, Fig. 5), no difirieron significativamente entre si, presentando sólo pequeñas diferencias de tamaño, por ejemplo en *Zea parviglumis* donde algunos de sus cromosomas tenían mayor longitud, o en *Zea diploperennis* donde el cromosoma 1 era de menor tamaño relativo.
- Cuando se comparon los cromosomas de *Zea perennis* ($2n=40$) con los de las otras especies de *Zea* con $2n=20$ (tabla 5, Fig. 5), pareciese haber una notoria diferencia entre ellos. Sin embargo, si se considera en *Zea perennis* como si fuesen un solo cromosoma (porque tienen igual longitud y relación entre los brazos), a cada uno de los pares cromosómico 1-2, 3-4, 7-8, 9-10 y 15-16 (Comparar Tabla 5 con Tabla 35 y 36), las diferencias se minimizan. Con este nuevo reordenamiento de los cromosomas de *Z. perennis* (Tabla 35), se puede observar que los pares cromosómicos 6 organizadores del nucleolo en todas las especies de *Zea* con $2n=20$, serían equivalentes al cromosoma 6 de *Zea perennis*, aunque este último es de mayor tamaño. Como consecuencia se podría inferir, que en el caso de *Z. perennis*, el cromosoma equivalente al cromosoma 6 organizador del nucleolo en las otras especies, habría mantenido la relación entre los brazos, pero habría perdido la capacidad de ser el organizador del nucleolo.

- Por otro lado, los pares cromosómicos 13-14 organizadores del nucleolo en *Zea perennis* (Tabla 5, 6 y Fig. 5), tienen una longitud equivalente al par cromosómico 6 de las especies con $2n=20$ pero una relación entre los brazos diferente (4,05). Es más notable aún que se observen dos pares de cromosomas organizadores del nucleolo en profase meiótica, ya que en la mayoría de las especies e híbridos poliploides con más de un par de cromosomas organizadores del nucleolo sólo uno actúa como tal mientras que el otro queda parcialmente inactivado (Olivera *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 1984). En el caso de *Zea perennis*, los dos pares de cromosomas organizadores del nucleolo son funcionales, pero esto no trae aparejado un incremento en el tamaño del nucleolo, ya que es uno de los más pequeños del Género *Zea* (Molina, 1976; Laurie y Bennett, 1985; Tito *et al.*, 1991; Poggio *et al.*, 1998).

Han *et al.* (2003) analizando la localización de las secuencias ribosomales 5S y 45S del DNAr en *Zea mexicana*, *Zea diploperennis* y *Zea perennis*. En *Zea mexicana* observaron que, al igual que ocurre en el maíz, la secuencia 5S daba una señal en el brazo largo del cromosoma 2, mientras que en *Zea diploperennis* y *Zea perennis* estaba localizada en el brazo corto de otros pares cromosómicos. En el híbrido entre *Zea mexicana* y *Zea diploperennis*, la secuencia 45S del DNAr estaba situada en la constricción secundaria del satélite del cromosoma 6. En *Zea perennis* la secuencia 45S estaba localizada en la constricción secundaria de dos pares cromosómicos diferentes que, a su vez, eran distintos del par cromosómico 6 donde se ubicaba en las otras especies.

Los resultados obtenidos por Han y colaboradores (2003) a nivel molecular son coincidentes con los que nosotros hemos obtenido a nivel citogenético. Por lo que respecta a nuestros datos, en todas las especies de *Zea* con $2n=20$ el organizador del nucleolo estaba ubicado en la constricción secundaria del cromosoma 6. En cambio, en *Zea perennis* estaba situado en las constricciones secundarias de los pares cromosómicos 13 y 14 (Tabla 5, Fig. 6), difiriendo entre sí solamente en el satélite de la constricción secundaria (Molina 1986).

Según Lacadena *et al.*, 1988; Lima Brito *et al.*, 1998; Cermeño *et al.*, 1984, cuando en una especie, ya sea por hibridación o duplicación cromosómica, se reúnen dos o más pares cromosómicos con organizadores nucleolares, en la mayoría de los casos solamente uno de ellos queda activo mientras que los otros son eliminados, inactivados o suprimidos total o parcialmente. La preferencia selectiva de la transcripción de los genes del RNAr esta dada en los términos de dominancia de un determinado organizador nucleolar (Vaughan *et al.*, 1993).

Zea perennis posee dos pares cromosómicos (13, 14) que mantienen activos los organizadores del nucleolo. Uno de los posibles mecanismos de la carencia de dominancia de uno de ellos puede deberse a que, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de las especies e híbridos poliploides (Santos *et al.*, 1984), no se habría producido anfiplastía⁴, (*amphiplasty*) en los cromosomas organizadores del nucleolo de *Zea perennis*.

⁴En especies de origen poliploide es conocido el fenómeno de anfiplastia, según el cual quedaría activo solo un par de organizadores nucleolares correspondiente a uno de los genomios mientras que no se expresan los organizadores correspondientes a los otros genomios intervinientes en la conformación del poliploide.

Analizando detalladamente las características morfológicas (longitud, relación entre los brazos y posición de los *knobs*) de los cromosomas de las especies con $2n=20$, se observan pequeñas diferencias entre ellos, ya sea en el tamaño o en la relación entre los brazos (tablas 5 y 6, Fig. 5). Sin embargo, en la mayoría de los híbridos, los cromosomas homeólogos de las distintas especies se apareaban no mostrando diferencias significativas. Estos resultados indicarían que cuando los cromosomas homeólogos del género *Zea* se aparean en un híbrido, tienden a acortarse o alargarse las zonas intercromosómicas para que se produzca el apareamiento cromosómico. Las excepciones fueron el dihíbrido *Zea mays* x *Zea parviglumis* y el trihíbrido entre *Z. mays*, *Z. diploperennis* y *Z. luxurians*, en los que se aparearon tres pares de cromosomas de distintos tamaños (Fig. 26).

Sin embargo, la diferencia más notable entre los cromosomas del maíz y las especies silvestres fue la posición de los *knobs*: mientras que el maíz carecía de *knobs* o eran intersticiales, en las especies silvestres eran terminales pudiendo ser pequeños, medianos o grandes (Tabla 7).

Ting, (1976), halló variación en la posición de los *knobs* en poblaciones de *Z. mexicana* de distinto origen geográfico. En concreto, dos de las poblaciones tenían *knobs* intersticiales mientras que en otras dos eran terminales. Es posible que las dos poblaciones de *Zea mexicana* cuyos cromosomas tenían *knobs* intersticiales hayan surgido como consecuencia de un proceso de introgresión con maíz, ya que estas dos especies se hibridan naturalmente con mucha facilidad siendo su descendencia fértil y no diferenciándose los híbridos, en la mayoría de los casos, de *Zea mexicana*.

Otra de las características que a nivel citogenético se ha tomado como indicador para diferenciar los cromosomas de una determinada especie es el tamaño de los *knobs*. En el caso de los híbridos entre las especies silvestres y el maíz, especialmente cuando se utiliza como progenitor femenino a la especie silvestre, se ha visto que se incrementaba de forma notoria el tamaño de los mismos, sobre todo los *knobs* terminales de las especies silvestres.

El incremento de tamaño de los *knobs* en los híbridos de *Zea* tiene aparentemente un fuerte componente de herencia citoplasmática. El efecto del citoplasma de las especies silvestres en los híbridos de maíz con los Teosintes, había sido analizado con anterioridad en un híbrido entre *Zea mexicana* y *Zea mays*, donde el citoplasma de la especie silvestre producía alteraciones fenotípicas, como por ejemplo espigas pequeñas y mosaico en las anteras, incremento en el tamaño del nucleolo, tendencia a adherirse de los cromosomas, esterilidad e incremento en el tamaño de los *knobs* (Mazoti, 1978; Mazoti y Velazquez1963, Allen, 2005).

Posteriormente, Mazoti y colaboradores con el objetivo de analizar el efecto del citoplasma de *Zea mexicana* en el maíz, obtuvieron líneas de maíz aloplásmicas con citoplasma de *Zea mexicana* y las compararon con el maíz original. En las líneas de maíz con citoplasma de *Zea mexicana* se observaron alteraciones en la distribución espacial de los cromosomas (Poggio *et al.*, 1996, 1997), poco vigor híbrido, no expresión del gen *ij*, variación en el ciclo vegetativo, mayor número de espigas e incremento en la cantidad de ADN y en el tamaño de los *knobs* (Mazoti, 1949, 1950, 1954a, b, 1963), por lo cual se concluyó que el citoplasma de *Zea mexicana* alteraba el comportamiento fenotípico y cromosómico del maíz.

Hemos observado que en la mayoría de los híbridos entre el maíz y las distintas especies silvestres de *Zea* aumenta significativamente el tamaño de los *knobs*, especialmente los terminales de las especies silvestres. En cambio, en los híbridos entre las especies silvestres, no se produjeron alteraciones en el tamaño de los *knobs*.

De los resultados obtenidos se deduce que sólo en los híbridos entre el maíz y las especies silvestres se ha producido variación en el tamaño de los *knobs*, existiendo influencia del citoplasma sobre los mismos. El citoplasma, puede interactuar con el DNA del híbrido afectando no solo los *knobs* sino también otros mecanismos celulares como por ejemplo:

- Producir un desequilibrio en la condensación de los cromosomas maternos y paternos, Ramesha y Sachan (1993).
- La consecuencia de reunir en una sola célula dos o más genomas de distintas especies bajo un solo citoplasma, pueden inducir cambios en el DNA lo que podría modificar la expresión de los genes o hacer que se expresen nuevas características no observadas en sus progenitores (Wendel, 2000; Wang *et al.*, 2004; Molina *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Chen, 2007; Chen *et al.*, 2008).
- Activar elementos transponible (Ananiev *et al.*, 1998a-b) o poner a manifiesto RNAs que producen silenciamiento o cambio en la expresión de los genes (Moazed, 2009).
- Expresión diferencial de sistemas meióticos anormales como por ejemplo los del cromosoma 10 (*ab10-1* y *ab10-2*) que generarían un mecanismo de amplificación de los *knobs* a través de un incremento de las zonas repetitivas de 180 pb (Running *et al.*, 2000) o producir una alteración en alguna o todas las secuencias de los TR-1 (Hsu *et al.*, 2003).

2 Apareamiento cromosómico en especies e híbridos del género *Zea*.

Para analizar el comportamiento cromosómico de las especies e híbridos de *Zea* se las agrupó teniendo cuenta el número cromosómico, analizando en cada grupo la regularidad meiótica, las configuraciones meióticas, la fertilidad del polen y la viabilidad de las semillas (Tabla 33).

De los resultados obtenidos se infirió lo siguiente:

- La configuración meiótica más frecuente en las especies de *Zea* con $2n=20$ era de 10II (Tabla 34). Las más estables y las que tenían mayor fertilidad eran el maíz y *Z. mexicana*, mientras que el resto de los teosintes presentaron menor regularidad meiótica con un bajo porcentaje de univalentes y menor fertilidad (Tabla 33). Las diferencias observadas en el comportamiento meiótico de las especies de *Zea*, pueden atribuirse en el caso del maíz, a la selección realizada por el hombre durante siglos que ha tendido a favorecer la fertilidad, y como consecuencia la regularidad meiótica; en cambio, en *Z. mexicana* este mecanismo se habría producido de forma natural, no conociéndose con exactitud las causas por las que los otros Teosintes tienen menor regularidad meiótica y fertilidad.
- Los híbridos entre las distintas especies de *Zea* con $2n=20$ presentaron un bajo porcentaje de univalentes (Tabla 33), siendo la configuración meiótica más frecuente de 10II (Tabla 34). En todos los casos se ha observado apareamiento entre los cromosomas homeólogos del maíz con los Teosintes, y de los Teosintes entre sí, siendo la fertilidad del polen y la viabilidad de

las semillas elevadas (Tabla 33). Sólo en los híbridos entre *Z. mays* x *Z. parviglumis* con $2n=20$ y el trihíbrido entre *Z. mays*, *Z. diploperennis* y *Z. luxurians* se observó un tetravalente, producto del apareamiento entre dos pares de cromosomas homeólogos. De esto se deduce que, a pesar de haberse diferenciado los cromosomas en los genomios A y B, para dar lugar a las distintas especies, los cambios producidos no han sido tan drásticos, de tal manera que han mantenido la capacidad de aparearse y dar descendencia fértil. Sólo en el trihíbrido entre *Z. mays*, *Z. diploperennis* y *Z. luxurians* se ha visto afectada parcialmente la fertilidad del polen, así como como la viabilidad de la semilla (Tabla 33).

- En los híbridos con $2n=30$, la configuración meiótica más frecuente era de $5III+5II+5I$ (Tabla 34), teniendo los cromosomas un comportamiento diferente al que tuvieron en los híbridos con $2n=20$. En los híbridos con $2n=30$, se mantuvo la capacidad de aparearse en los cromosomas homeólogos del genomio A ($5III$), mientras que en el genomio B se produjeron dos situaciones diferentes o bien se aparearon preferencialmente los cromosomas homólogos en *Z. mays* con $2n=40$ o los homeólogos de *Z. perennis* para dar los $5II$, quedando como univalentes ($5I$), los cromosomas homeólogos de la otra especie que formaba el híbrido.
- En el caso de las especies e híbridos con $2n=40$ (Tabla 34) el comportamiento fue dispar. Como era de esperar, en *Z. mays* con $2n=40$ los cromosomas homólogos tendieron a aparearse entre sí, tanto los del genomio A, por un lado, como los del B, por otro, dando como consecuencia un alto porcentaje de tetravalentes (8,34). El caso opuesto fue el del híbrido *Z. parviglumis* x *Z. diploperennis* con $2n=40$ en el que, al ser el

producto de la duplicación cromosómica del híbrido *Z. parviglumis* x *Z. diploperennis* con $2n=20$, los cromosomas homólogos de cada especie tendieron a aparearse preferencialmente entre sí y no con los homeólogos de la otra especie, dando como consecuencia un bajo porcentaje de tetravalentes (2,02) y un elevado número de bivalentes (15,27). En *Z. perennis* y en el resto de los híbridos con $2n=40$, se vio claramente diferenciado el apareamiento entre los cromosomas homeólogos del genomio A (5IV) y los homólogos del genomio B de cada una de las especies (10II) (Tabla 33).

Del análisis conjunto de las configuraciones meióticas de las especies e híbridos de *Zea*, se pudo inferir que existen 5 cromosomas (genomio A) que ha conservado su estructura a través del tiempo, manteniendo los cromosomas homeólogos la capacidad de aparearse como si fuesen homólogos. Los otros 5 cromosomas (genomio B), se han diferenciado de tal manera, que sólo se aparean los homeólogos cuando no están presentes los cromosomas homólogos. Esto último se ha observado claramente en los híbridos con $2n=20$. En los híbridos con $2n=30$, así como en la mayoría de los híbridos con $2n=40$, se observó cómo los 5 cromosomas del genomio A se apareaban en su totalidad, mientras que los 5 cromosomas del genomio B se apareaban en la mayoría de los casos con su homólogo correspondiente.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se podría considerar que el Género *Zea* podría haber tenido el siguiente mecanismo evolutivo (Fig. 33): 1- A partir de un ancestro común poliploide con genomio AAAA se habrían diferenciado los cromosomas homólogos dando lugar a una especie diploide con dos genomios A y B, que

habría tenido una mayor ventaja adaptativa al ser más estable por ser diploide. 2- El siguiente paso evolutivo, habría sido la diferenciación del genomio B para dar lugar a las distintas especies de *Zea* 3- Las especies habrían mantenido su capacidad de cruzarse hasta la actualidad por no haber sufrido cambios drásticos los cromosomas homeólogos. 4- Esta diferenciación evolutiva, no drástica a nivel cromosómico, posiblemente se haya visto favorecida por el aislamiento geográfico que mantuvieron las especies (Ruiz *et al.*, 2001).

La diferenciación del genomio A para dar lugar al B, pudo haberse debido a uno o varios factores, entre los que cabe citar los siguientes:

- Inversiones cromosómicas: de los resultados obtenidos se ha determinado que las especies de *Zea* se caracterizan por tener de una a tres inversiones paracéntricas o pericéntricas, ya que en los híbridos con $2n=20$ se han observado de 1 a 3 puentes de inversión. De forma similar, Ting (2005) halló una inversión que involucraba el 35% del brazo largo del cromosoma 3 y otra que afectaba el 65% del brazo corto del cromosoma 9. Pasapuleti y Galinat (1982), observaron en híbridos de maíz y *Z. diploperennis* una inversión paracéntrica cercana al centrómero en el brazo largo del cromosoma 5, también hallada en nuestros materiales, y otra inversión terminal en el brazo largo del cromosoma 9.
- Translocaciones entre cromosomas no homólogos (Weber y Alexander, 1972)
- Divergencia estructural de los cromosomas homólogos por eliminación de secuencias cromosómicas (Feldman *et al.*,

1997; Salina *et al.*, 2004), dando lugar a cromosomas homeólogos de distinto tamaño, como los observados en el trihíbrido entre *Z. mays*, *Z. diploperennis* y *Z. luxurians*.

- Reordenamientos y cambio de función de los genes provenientes de un ancestro en común (Feldman *et al.*, 1997; Salina *et al.*, 2004). Este mecanismo pudo dar lugar a características fenotípicas nuevas como por ejemplo la clorantia en los híbridos entre el maíz y los teosintes.

3 Efecto del número cromosómico en las características fenotípicas de los híbridos

El maíz y las especies silvestres difieren dramáticamente en la arquitectura de la planta y la inflorescencia femenina (Briggs *et al.*, 2007). Por esta razón, las características fenotípicas más estudiadas en los híbridos entre el maíz y los Teosintes han sido el tipo y número de espigas, el número de espiguillas y el tipo de granos (desnudos o cubiertos). Las conclusiones a la que llegaron los distintos autores fueron en muchos casos claramente contradictorias (Collins y Kempton, 1920; Langhan, 1940; Rogers, 1950; Galinat, 1971; Szabo y Burr, 1996; Provan *et al.*, 1999; Yamasaki *et al.*, 2005; Allen, 2005; Briggs *et al.*, 2007), a pesar de que en todos los casos los híbridos analizados tenían un nivel de ploidía de $2n=20$.

Del análisis de las características fenotípicas de los híbridos entre el maíz y los Teosintes con distinto nivel de ploidía pudo determinarse que la expresión fenotípica de algunos caracteres tales como el tipo de espiga y grano, la dehiscencia de los granos, el número de tallos, el número de espigas por tallo y la perennidad estaban íntimamente

relacionados con el nivel de ploidía y el número de cromosomas que aportaba cada uno de los progenitores.

Un claro ejemplo de lo anteriormente indicado fueron los resultados obtenidos con los híbridos entre las mismas especies progenitoras, pero que variaban en su nivel de ploidía. Es el caso de los híbridos entre maíz y *Z. perennis* con $2n=30$ y $2n=40$. El híbrido entre *Z. mays* x *Z. perennis* con $2n=30$ (en el que *Z. perennis* aportaba el doble de cromosomas que *Z. mays*) era semejante a *Z. perennis*, (Tabla 25, Fig. 18); en cambio, el híbrido entre *Z. mays* x *Z. perennis* con $2n=40$ (en el que ambas especies aportaban el mismo número de cromosomas) tenía características intermedias entre ambos progenitores (Tabla 25, Fig. 18). De estos resultados se deduce que algunos caracteres no muestran una herencia mendeliana clásica, sino que su expresión sería el producto de la interacción entre dosis de genes aportados por cada una de las especies progenitoras.

Para Yamasaki *et al.*, (2007), la diferencia a nivel genético entre el maíz y los teosintes sería baja, ya que analizando secuencias de DNA de una importante cantidad de genes de maíz y *Z. parviglumis*, encuentran que, pese a la fuerte presión de selección realizada sobre el maíz, la especie cultivada se diferenciaría de la especie silvestre en tan solo un 2% de sus genes.

Estudios moleculares recientes de Doebley y colaboradores han demostrado que varios de los genes involucrados en la diferenciación entre el maíz y los Teosintes, como por ejemplo *dwarf8* (*d8*), *indeterminate growth1* (*id1*), *teosinte branched 1* (*tb1*), *terminal ear 1* (*te1*), *tassel seed 2* (*ts2*), *zea agamous like 1* (*zagl1*), *zea apetala homologous 1* (*zap1*), *zea centroradiales 1* (*zen1*), *zea floricaula* Leary

2 (*zfl2*), habrían evolucionado en forma muy rápida (Doebley *et al.*, 1994) y estarían influenciados en su expresión por genes reguladores (Weber *et al.*, 2007, 2008; Briggs *et al.*, 2007). Estos cambios, en muchos casos, se verían favorecidos por producirse mutaciones en los genes como por ejemplo en el gen *tb1* (Clark *et al.*, 2005, 2006) o inserción de transposones, tal y como por ejemplo ocurre en el gen *yellow 1* (*y1*). En este gen, que normalmente determina un alto contenido de caroteno en el grano, la inserción de un transposon en el promotor hizo que se expresase en hojas (Doebley *et al.*, 2006).

Es posible que la expresión diferencial de varios caracteres (tales como tipo de espiga, granos encerrados en cúpulas o desnudos, que se desprendan o no a la madurez, que tengan o no macollos) hallados en los híbridos entre maíz y los Teosintes con distinto nivel de ploidía se deba a varios mecanismos genéticos. Entre ellos cabría citar los efectos de dosis génica (Fu *et al.*, 2004), la recombinación desigual o no recíproca de los cromosomas en meiosis (Ritchter *et al.*, 1995; Juretic *et al.*, 2005), los cambios rápidos de funciones o el silenciamiento de genes por metilación (Valledor *et al.*, 2007), la inserción de elementos transponibles como los helitrones (Lal *et al.*, 2003, 2005; Brunner *et al.*, 2005; Lal y Hannah, 2005), la incorporación de fragmentos de genes relacionados (Jiang *et al.*, 2004; Juretic *et al.*, 2005), la diferenciación de genes parálogos (Emrich *et al.*, 2007), la acción de genes reguladores (Doebley *et al.*, 1994; Weber *et al.*, 2007, 2008; Briggs *et al.*, 2007) y que darían como consecuencia una expresión diferencial de los genes en cada uno de los híbridos analizados. Todo esto se vería acentuado por la acción del hombre que favoreció o no la fijación de algunos caracteres en el proceso de domesticación y mejora del maíz (Yamasaki *et al.*, 2005).

Conviene destacar, aunque aún esté poco estudiado, lo que sucede en el genoma cuando se duplica el número de genes en un autoploiploide o se combinan dos o más genomas divergentes en un alopoliploide. A corto plazo, esto puede provocar inestabilidad genómica, desequilibrio cromosómico, cambios profundos en la regulación génica y alteraciones reproductivas, entre otros muchos cambios (Chen, 2007). Asimismo, en el caso de los alopoliploides pueden establecerse relaciones de compatibilidad o incompatibilidad entre el citoplasma de una especie y el núcleo de otra, o bien entre dos o más genomas divergentes, lo que podría inducir cambios rápidos en la estructura genómica, en la expresión de los genes, en la fertilidad, en la floración y en el vigor híbrido (Chen, 2007, Wang *et al.*, 2004, Allen 2005). Estos cambios podrían verse favorecidos al activarse mecanismos que modificarían las secuencias en el DNA, las posiciones *cis* o *trans* de los genes y los mecanismos reguladores, produciendo una expresión diferencial de los genes homeólogos y como consecuencia un cambio en la expresión fenotípica (Chen, 2007; Chen *et al.*, 2008; Jatimlinsky *et al.*, 2004) o silenciamiento transcripcional de los genes (Moazed 2009). Es muy probable que las expresiones diferenciales de algunos genes o la aparición de nuevas características en los alopoliploides del Género *Zea* puedan explicarse por alguno de estos mecanismos.

4 Apareamiento críptico de los cromosomas homeólogos en el género *Zea*.

El tratamiento con concentraciones bajas de colchicina ($0,5 \times 10^{-4}$ M) favorecería tanto el apareamiento críptico de los cromosomas homeólogos (Driscoll y Barber, 1967; Feldman y Avivi, 1988) como el apareamiento intergenómico en las especies con genomas homeólogos (Jackson y Murray, 1983). De esta manera, se podría

favorecer el intercambio de material genético entre genomas aislados evolutivamente (Dover y Riley, 1973).

Analizando el comportamiento meiótico de las especies de *Zea* con $2n=20$ tratadas con solución diluida de colchicina (Fig. 27), se deduce que, a excepción de *Zea diploperennis* donde no se hallaron diferencias significativas entre el material tratado y el testigo, en el resto de las especies se produjo apareamiento de los cromosomas homeólogos hasta un máximo de 5IV.

La falta de apareamiento de los cromosomas homeólogos de *Zea diploperennis* tratados con solución diluida de colchicina podría deberse a lo siguiente:

- El tratamiento con colchicina no habría alterado la relación espacial de los cromosomas (Driscoll y Darvey, 1970), manteniendo su ordenamiento (Feldman y Avivi, 1988) y el anclaje a la membrana nucleolar (Bass *et al.*, 2000), lo que favorecería el apareamiento de los cromosomas homólogos (Loidl, 1990; Bass, 2003).
- El gen *pam1* (*plural abnormalities of meiosis1*), que interviene en los mecanismos presinápticos (Felman y Avivi, 1988; Bozza y Pawlowski, 2008) y en la reorganización cromosómica que da lugar a la formación del *bouquet* (Zickler y Kleckner, 1998; Bass *et al.*, 2000), podría tener un comportamiento distinto en *Z. diploperennis* que en el resto de las especies de *Zea*.
- La acción del gen *Ph* o su equivalente en *Z. diploperennis* no sería inhibido por la solución diluida de colchicina.
- Los cromosomas de *Z. diploperennis* no fuesen homeólogos, lo que podría darse si se hubiese obtenido *Z. diploperennis* a partir de un haploide de *Z. perennis*.

Cualquiera que fuese el mecanismo evolutivo que originó la especie *Z. diploperennis*, dio como resultado un comportamiento diferencial de sus cromosomas, siendo interesante analizar en el futuro el posible origen de esta especie a partir de un haploide de *Z. perennis*.

Del análisis del comportamiento de los híbridos de *Zea* con $2n=20$, tratados con solución diluida de colchicina (Figura 28) se deduce que los híbridos entre *Z. mays* con *Z. mexicana* y *Z. mays* con *Z. parviglumis* con $2n=20$ son los que manifestaron el mayor apareamiento críptico de los cromosomas homeólogos. Con menor frecuencia, se ha visto favorecido el apareamiento de los cromosomas homeólogos hasta un máximo de 5IV en el híbrido entre *Z. mays* con *Z. luxurians* y en el trihíbrido entre *Z. mays*, *Z. diploperennis* y *Z. luxurians*. No habiendo diferencias significativas entre el material tratado y sin tratar en los híbridos entre *Z. mays* con *Z. diploperennis* y *Z. diploperennis* con *Z. luxurians*.

Como puede observarse en la Figura 28, el apareamiento críptico de los cromosomas homeólogos en los híbridos del Género *Zea* con $2n=20$ variaba según el cruzamiento analizado, siendo mayor en los híbridos entre las especies más cercanas evolutivamente (*Z. mays*, *Z. mexicana* y *Z. parviglumis*) que en las más alejadas (*Z. luxurians*, *Z. diploperennis* y *Z. perennis*).

En el híbrido entre *Z. mays* con *Z. luxurians* y en el trihíbrido entre *Z. mays*, *Z. diploperennis* y *Z. luxurians* (Fig. 28), el apareamiento críptico fue similar entre sí y menor que el observado en los híbridos entre las especies con mayor afinidad cromosómica. Es probable que el menor apareamiento críptico en el híbrido entre *Z. mays* x *Z. luxurians* se deba

a la diferenciación cromosómica de los cromosomas homeólogos debido a que las especies parentales están más alejadas evolutivamente. En el trihíbrido es probable que los tetravalentes sean el producto del apareamiento de los genomas A y B de *Z. mays* y *Z. luxurians*, ya que *Z. diploperennis* no induce el apareamiento críptico de los cromosomas homeólogos.

Del análisis del comportamiento meiótico de los cromosomas de *Zea* en la especie y en los híbridos con $2n=30$ tratados con solución diluida de colchicina (Fig. 29) se deduce lo siguiente:

- En *Z. mays* con $2n=30$ no se observaron diferencias significativas entre el material tratado y sin tratar. Esta falta de respuesta se podría deber a un apareamiento preferencial de los cromosomas homólogos (Santos *et al.*, 1984, Jenkinsy y Chatterjee, 1994). No habiendo aún una explicación clara de por qué en el maíz con $2n=20$ se produce apareamiento críptico entre los genomas A y B (Fig. 31A) y se inhibe a un nivel de ploidía superior.
- En los híbridos entre *Z. mays* x *Z. parviglumis* con $2n=30$ (Tabla 20) y *Z. luxurians* x *Z. perennis* (Tabla 23) se observó, que en el material sin tratar con colchicina, tenía un elevado apareamiento entre los cromosomas homeólogos de las dos especies habiéndose hallado hasta un máximo de 10III. Con el tratamiento de colchicina se incrementó levemente el porcentaje de III.
- La mayor respuesta al tratamiento con colchicina se tuvo en el híbrido de *Z. mays* x *Z. perennis* con $2n=30$ (Fig. 29, 31C), donde se incrementó en forma notoria el porcentaje de III hasta un máximo de 10. Esto demostraría que los cromosomas de

maíz y *Z. perennis* serían homeólogos, a pesar de haberse diferenciado evolutivamente.

- Las especies e híbridos con $2n=40$, manifestaron un comportamiento diferente según el material analizado. En el caso de *Z. mays* con $2n=40$ no se hallaron diferencias significativas entre el material tratado y sin tratar (Fig. 30). En ambos casos se aparearon los cromosomas homólogos de los genomios A y B (Fig. 30), dando un máximo de 10IV, no induciendo la colchicina en ningún caso el apareamiento entre los cromosomas de los genomios homeólogos del maíz, razón por lo cual no se observaron apareamientos cromosómicos hexavalentes u octovalentes
- En el caso de *Z. perennis* (Fig. 30 y 31B), el tratamiento con colchicina sólo induce el apareamiento entre los cromosomas homeólogos del genomio B, observándose hasta un máximo de 10 IV. Los cromosomas del genomio B, en el material sin tratar, se aparearon como II; en cambio, los del genomio A se aparearon como IV. En ningún caso se observó apareamiento entre los cromosomas del genomio A y B.
- En los híbridos entre *Z. diploperennis* x *Z. perennis* con $2n=40$, *Z. mays* x *Z. perennis* con $2n=40$ (Fig. 31D) y el trihíbrido entre *Z. mays*, *Z. diploperennis* y *Z. perennis* (Fig. 32B) tratados con solución diluida de colchicina (Fig.30), los cromosomas del genomio A de las especies que conforman el híbrido se han apareado a igual que en el material sin tratar, induciéndose con la colchicina el apareamiento críptico de los cromosomas homeólogos del genomio B, observándose en todos los casos hasta un máximo de 10 IV.

Integrando los resultados obtenidos del análisis citogenético de las especies e híbridos del Género *Zea*, se podría considerar que un posible mecanismo de diferenciación de las especies de *Zea* consistiría en la duplicación del genomio A de una especie diploide que posteriormente se diferenció en los genomios homeólogos A y B (Fig. 33). El genomio homeólogo A se habría mantenido a través del tiempo sin diferenciarse, lo que permitiría que, en la actualidad, continúen apareándose los cromosomas homeólogos en los híbridos entre las distintas especies como si fuesen homólogos. La diferenciación del genomio B sería el proceso evolutivo que habría dado lugar a las distintas especies de *Zea*, favorecido posiblemente por el aislamiento geográfico de las mismas.

TABLAS Y FIGURAS



Tabla 5: Longitud relativa de los cromosomas de las especies del Género *Zea*.

Cromosoma	Zm	Zmex	Zpar	Zl	Zd	Zp
1	82,40	83,20	89,30	79,20	75,65	86,18
2	66,50	74,10	82,94	76,80	75,00	86,18
3	58,78	62,30	74,20	66,80	71,62	67,12
4	62,00	59,20	65,48	65,19	67,17	67,12
5	59,82	58,48	56,60	62,10	61,51	66,54
6	48,73 O.N.	47,30 O.N.	49,90 O.N.	46,22 O.N.	44,97 O.N.	62,79
7	46,73	46,52	46,38	48,90	47,79	61,94
8	41,78	45,66	43,22	47,10	45,88	61,94
9	43,24	43,80	41,66	44,00	44,25	57,09
10	36,93	35,96	37,97	37,50	35,77	57,09
11						56,93
12						53,98
13						50,98 O.N.
14						50,00 O.N.
15						47,08
16						47,08
17						43,35
18						36,17
19						29,06
20						23,51

Longitud relativa de los cromosomas: Es el tamaño relativo que adquiere el cromosoma después de la aplicación de una fuerza de aplastamiento (*squash*).

O.N.: Cromosoma organizador del nucleolo.

Especies parentales: **Zm:** *Zea mays*; **Zmex:** *Zea mexicana*; **Zpar:** *Zea parviglumis*; **Zl:** *Zea luxurians*; **Zd:** *Zea diploperennis*; **Zp:** *Zea perennis*.

Tabla 6: Relación entre los brazos de los cromosomas del Género *Zea*

Cromosoma	Zm	Zmex	Zpar	Zl	Zd	Zp
1	1,30	1,31	1,29	1,41	1,07	1,21
2	1,25	1,26	1,17	1,12	1,11	1,21
3	2,00	2,07	1,98	1,80	1,27	8,40
4	1,60	1,47	1,54	2,21	2,78	8,40
5	1,10	3,44	3,52	3,92	3,52	1,03
6	7,10	6,74	6,22	6,60	6,20	2,61
7	2,80	2,76	2,24	2,54	2,18	6,29
8	3,20	3,92	4,10	4,22	4,00	6,29
9	1,80	1,76	1,79	1,74	1,41	2,53
10	2,80	3,6	3,42	3,49	3,66	2,53
11						1,74
12						4,40
13						4,54
14						4,89
15						4,05
16						4,05
17						2,00
18						1,57
19						1,87
20						1,50

Relación entre los brazos: es la relación existente entre el tamaño del brazo más largo y el más corto del cromosoma (brazo largo % brazo corto)

Especies parentales: **Zm:** *Zea mays*; **Zmex:** *Zea mexicana*; **Zpar:** *Zea parviglumis*; **Zl:** *Zea luxurians*; **Zd:** *Zea diploperennis*; **Zp:** *Zea perennis*.

Tabla 7: Posición de los *knobs* en los cromosomas del Género *Zea*.

Cromosoma	<i>Z. mays</i>	<i>Z. mexicana</i>	<i>Z. parviglumis</i>	<i>Z. luxurians</i>	<i>Z. diploperennis</i>	<i>Z. perennis</i>
1		Terminal b.l. y b.c.	Terminal b.l. y b.c.	Terminal b.l. y b.c.	Terminal b.l. y b.c.	Terminal b.l. y b.c.
2	Subterminal b.l.	Terminal b.l.	Terminal b.l. y c.	Terminal b.l.	Terminal b.c.	Terminal b.l.
3		Terminal b.l.y b.c.	Terminal b.l.	Terminal b.l.		Terminal b.l.
4	Subterminal b.l.	Terminal b.l.	Terminal b.l.	Terminal b.l.	Terminal b.l.	
5	Subterminal b.l.	Terminal b.l.	Terminal b.c.	Terminal b.l.	Terminal b.l.	Terminal b.l.
6	Subterminal b.l.	Terminal b.l.	Terminal b.l.	Terminal b.l.	Terminal b.l.	Terminal b.l. y b.c.
7	Subterminal b.l.	Terminal b.c.	Terminal b.l.	Terminal b.l.		Terminal b.l.
8	Subterminal b.l.	Terminal b.l.	Terminal b.l.	Terminal b.l.	Terminal b.l.	Terminal b.l.
9	Subterminal b.c.	Terminal b.l.	Terminal b.l.	Terminal b.l.	Terminal b.l.	Terminal b.l.
10			Terminal b.l.	Terminal b.l.		Terminal b.l.
11						
12						
13						Terminal b.c.
14						
15						Terminal b.l.
16						Terminal b.l.
17						Terminal b.l. y b.c.
18						Terminal b.c.
19						
20						

b.l.= Brazo largo; b.c.= Brazo corto

Tabla 8: Configuraciones meióticas de *Zea mays* ssp *mays* con 2n=20.

Especie	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
Zm20	20	200	0	10	0	0	100.00
		\bar{x}	0	10.00	0	0	
Límites extremos			0	10	0	0	

Tabla 9: Configuraciones meióticas de *Zea mays* ssp. *mays* con 2n=40.

Especie	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
Zm40	40	142	0	0	0	10	30.28
			0	2	0	9	23.94
			0	4	0	8	16.90
			0	6	0	7	10.52
			0	8	0	6	7.75
			0	10	0	5	4.23
			0	12	0	4	0.70
			0	14	0	3	0.70
			1	6	1	6	1.40
			1	8	1	5	1.40
			1	0	1	9	1.40
			1	2	1	8	0.70
		\bar{x}	0.04	3.24	0.04	8.34	
Límites extremos			0 - 1	0 - 14	0 - 1	3 - 10	

Tabla 10: Configuraciones meióticas de *Zea mays* ssp *mexicana* observadas en diacinesis-metafase.

Especie	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
Zmex	20	136	0	10	0	0	97.00
			2	9	0	0	3.00
		\bar{x}	0.06	9.97	0	0	
Límites extremos			0 - 2	9 - 10			

Tabla 11: Configuraciones meióticas observadas en *Zea mays* ssp *parviglumis* con $2n=20$

Híbrido	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
Zpar	20	181	0	10	0	0	81.76
			2	9	0	0	13.25
			4	8	0	0	4.97
			\bar{x}	0.46	9.76	0	0
Límites extremos			0 - 4	8 - 10			

Tabla 12: Configuraciones meióticas observadas en diacinesis - metafase I en *Zea luxurians*.

Híbrido	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
Zl	20	142	0	10	0	0	82.00
			2	9	0	0	14.00
			4	8	0	0	4.00
			\bar{x}	0.44	9.78	0	0
Límites extremos			0 - 4	8 - 10			

Tabla 13: Configuraciones meióticas observadas en diacinesis- metafase I en *Zea diploperennis*.

Especie	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
Zd	20	134	0	10	0	0	73,00
			2	9	0	0	23,00
			1	8	1	0	3,00
			3	7	1	0	1,00
			\bar{x}	0,52	9,68	0	0
Límites extremos			0 - 3	7 - 10	0 - 1		

Tabla 14: Configuraciones meióticas observadas en diacinesis-metafase I de un clon de *Zea perennis*.

Especie	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
Zp	40	134	0	10	0	5	54.47
			0	12	0	4	20.74
			0	14	0	3	6.70
			0	8	0	6	5.22
			0	16	0	2	3.73
			0	18	0	1	1.50
			2	11	0	4	2.98
			2	9	0	5	1.50
			2	15	0	2	0.74
			4	8	0	5	0.74
			1	10	1	4	0.74
			1	16	1	1	0.74
2	13	0	3	0.74			
		\bar{x}	0.10	11.01	0.01	4.70	
Límites extremos			0 - 4	8 - 18	0 - 1	1 - 6	

Tabla 15: Configuraciones meióticas en diacinesis-metafase I del híbrido entre *Zea mays* y *Zea mexicana*.

Especie	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
ZmxZmex	20	130	0	10	0	0	90.77
			2	9	0	0	9.23
			\bar{x}	0.18	9.91	0	0
Límites extremos			0 - 2	9 - 10			

Tabla 16: Configuraciones meióticas del híbrido entre *Zea mays* por *Zea luxurians* con 2n=20.

Híbrido	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
ZmxZl	20	157	0	10	0	0	63.48
			2	9	0	0	25.81
			4	8	0	0	8.32
			6	7	0	0	2.38
			\bar{x}	0.99	9.50	0	0
Límites extremos			0 - 6	7 - 10			

Tabla 17: Configuraciones meióticas en diacinesis-metafase I del híbrido de *Zea mays* x *Zea diploperennis* con 2n=20.

Híbrido	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
ZmxZd20	20	181	0	10	0	0	69,06
			2	9	0	0	24,31
			4	8	0	0	6,08
			6	7	0	0	0,55
			\bar{x}	0,76	9,62	0	0
Límites extremos			0 - 6	7 - 10			

Tabla 18: Configuraciones meióticas en diacinesis-metafase I del híbrido entre *Zea diploperennis* por *Zea luxurians*

Especie	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
ZdxZl	20	200	0	10	0	0	75,50
			2	9	0	0	18,50
			4	8	1	0	4,50
			0	8	0	1	0,50
			\bar{x}	0,55	9,61	0,05	0,01
Límites extremos			0 - 4	8 - 10	0	0 - 1	

Tabla 19: Configuraciones meióticas en diacinesis-metafase I del híbrido entre *Zea mays* por *Zea parviglumis* con 2n=20

Híbrido	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
ZmxZpar20	20	177	0	10	0	0	74,27
			0	8	0	1	14,86
			2	9	0	0	9,15
			4	8	0	0	1,15
			1	6	1	1	0,57
\bar{x}	0,23	9,56	0,05	0,15			
Límites extremos			0 - 4	6 - 10	0 - 1	0 - 1	

Tabla 20: Configuraciones meióticas en diacinesis-metafase I del híbrido entre *Zea mays* (2n=40) por *Zea parviglumis* con 2n=20 teniendo el híbrido (ZmxZpar30) un número cromosómico de 2n=30

Híbrido	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
ZmxZpar30	30	128	5	5	5	0	29.68
			6	6	4	0	20.31
			7	7	3	0	15.62
			8	8	2	0	11.72
			4	4	6	0	7.81
			3	3	7	0	5.47
			9	9	1	0	3.91
			10	10	0	0	1.56
			2	2	8	0	0.78
			8	5	4	0	2.34
		7	10	1	0	0.78	
		\bar{x}	5.97	5.93	4.05	0	
Límites extremos			2 - 10	2 - 10	0 - 8		

Tabla 21: Configuraciones meióticas en diacinesis-Metafase I del híbrido entre *Zea mays* (2n=40) por *Zea mays* (2n=20)

Híbrido	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
ZmxZm30	30	181	0	0	10	0	9.35
			1	1	9	0	16.50
			2	2	8	0	41.25
			3	3	7	0	13.75
			4	4	6	0	8.25
			5	5	5	0	5.50
			6	6	4	0	2.75
			7	7	3	0	1.10
			8	8	2	0	0.55
			9	9	1	0	0.55
		\bar{x}	2.35	2.35	7.15	0	
Límites extremos			0 - 9	0 - 9	1 - 10		

Tabla 22: Configuraciones meióticas del híbrido entre *Zea perennis* por *Zea mexicana* con $2n=30$.

Híbrido	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
ZpxZmex	30	180	8	8	2	0	1,66
			7	7	3	0	4,44
			6	6	4	0	25,53
			4	7	4	0	4,99
			7	4	5	0	1,67
			5	5	5	0	54,95
			3	6	5	0	4,99
			4	4	6	0	1,11
			5	3	7	0	0,55
		\bar{x}	5,26	5,50	4,58	0	
Límites extremos			3 - 8	3 - 8	2 - 7		

Tabla 23: Configuraciones meióticas en diacinesis-Metafase I del híbrido *Zea luxurians* por *Zea perennis*

Híbrido	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
Zl x Zp	30	160	0	0	10	0	1,20
			1	1	9	0	1,20
			2	2	8	0	2,40
			3	3	7	0	11,10
			4	4	6	0	13,50
			3	7	6	0	1,20
			5	5	5	0	27,00
			7	6	5	0	1,20
			6	6	4	0	20,90
			7	7	3	0	5,00
			5	8	3	0	1,20
			9	6	3	0	1,20
			8	8	2	0	7,00
			20	2	2	0	1,20
			9	9	1	0	1,20
10	10	0	0	1,20			
		\bar{x}	5,57	5,02	4,71	0	
Límites extremos			0 - 20	0 - 10	0 - 10		

Tabla 24: Resultados del cruzamiento de diferentes líneas de maíz con $2n=40$ (progenitor femenino) por *Zea perennis*.

Genotipo Maíz	Espigas polinizadas	Cariopses desarrollados	% de granos germinados	Fertilidad del polen de la F1(%)
N103A	10	0	0	0
N104B	10	39	0	0
N107B	10	400	20	50-60
N107C	10	2450	100	70-90
90-2189	10	0	0	0

Tabla 25: Características fenotípicas y fertilidad del polen en híbridos de *Zea mays* y *Zea perennis* con diferente nivel de ploidía

ZmxZp30	ZmxZp40
1. Perenne	1. Anual o bianual
2. Viabilidad de las semillas 1%	2. Viabilidad de la semillas 60-80%
3. Fertilidad del polen de 3 a 5%	3. Fertilidad del polen 50-90%
4. Espigas dísticas cuyo raquis se desarticula y cae la semilla a la madurez	4. Espigas con 2-4 hileras con raquis duro que no se desarticula a la madurez
5. Muy macolladora con un promedio de 20 tallos por planta	5. Poco macolladora con un promedio de 4 tallos por planta
6. Con rizomas cortos	6. Sin rizomas
7. Se multiplica asexualmente por rizomas	7. No se multiplica asexualmente
8. No se hibrida naturalmente	8. Se hibrida naturalmente
9. Florece con días cortos.	9. Indiferente al fotoperíodo
10. Se produce clorantia.	10. No se ha observado clorantia

Tabla 26: Configuraciones meióticas del híbrido entre *Zea mays* ssp. *mays* por *Zea perennis* con 2n=30.

Híbrido	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
ZmxZp30	30	140	7	7	3	0	2.14
			6	6	4	0	25.71
			4	7	4	0	5.00
			7	4	5	0	1.43
			5	5	5	0	53.57
			3	6	5	0	5.71
			1	7	5	0	0.71
			4	4	6	0	5.00
			5	3	7	0	0.71
			\bar{x}		5.07	5.39	4.71
Límites extremos			1 - 7	3 - 7	3 - 7		

Tabla 27: Configuraciones meióticas del híbrido entre *Zea mays* (2n=40) por *Zea perennis* con 2n=40.

Híbrido	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%		
			I	II	III	IV			
ZmxZp40	40	224	0	20	0	0	0.45		
			0	18	0	1	3.12		
			0	16	0	2	8.48		
			0	14	0	3	16.96		
			0	12	0	4	21.43		
			0	10	0	5	27.23		
			1	16	1	1	0.45		
			1	8	1	5	2.23		
			1	12	1	3	2.23		
			2	11	0	4	0.45		
			2	9	0	5	2.23		
			2	7	0	6	0.45		
			2	13	0	3	1.80		
			4	12	0	3	0.45		
			2	7	0	6	0.45		
			\bar{x}		0.20	11.62	0.03	4.12	
			Límites extremos			0 - 4	7 - 20	0 - 1	0 - 6

Tabla 28: Configuraciones meióticas del híbrido entre *Zea diploperennis* por *Zea perennis* con $2n=30$.

Híbrido	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
ZdxZp30	30	166	8	8	2	0	1,81
			7	7	3	0	3,01
			6	6	4	0	23,48
			4	7	4	0	4,82
			7	4	5	0	2,41
			5	5	5	0	56,58
			3	6	5	0	4,21
			1	7	5	0	0,60
			4	4	6	0	3,01
		\bar{x}	5,33	5,30	4,57	0	
Límites extremos			1 - 8	4 - 8	2 - 6		

Tabla 29: Configuraciones meióticas del híbrido entre *Zea diploperennis* por *Zea perennis* con $2n=40$

Híbrido	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
ZdxZp40	40	214	0	10	0	5	31,78
			0	12	0	4	20,09
			0	14	0	3	15,42
			0	8	0	6	11,22
			0	16	0	2	3,27
			0	18	0	1	2,33
			0	6	0	7	0,93
			1	10	1	4	3,74
			2	11	0	4	3,27
			2	13	0	3	2,80
			2	9	0	5	2,33
			1	12	1	3	1,40
			1	14	1	2	0,93
			4	10	0	4	0,47
					\bar{x}	0,24	11,29
Límites extremos			0 - 4	6 - 18	0 - 1	1 - 7	

Tabla 30: Configuraciones meióticas del híbrido entre *Zea parviglumis* por *Zea diploperennis* con $2n=40$.

Híbrido	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
ZparxZd40	40	106	0	4	0	8	0,94
			0	6	0	7	0,94
			0	10	0	5	2,83
			0	12	0	4	9,43
			0	14	0	3	7,55
			0	16	0	2	16,04
			0	18	0	1	11,32
			0	20	0	0	3,77
			2	13	0	3	0,94
			2	11	0	4	0,94
			4	18	0	0	4,72
			2	19	0	0	4,72
			6	17	0	0	0,94
			2	15	0	2	9,43
			4	12	0	3	0,94
			4	10	0	4	0,94
			2	17	0	1	7,55
			4	16	0	1	3,77
			3	11	1	3	0,94
			2	13	0	3	3,77
1	16	1	1	3,77			
1	12	1	3	0,94			
4	14	0	2	1,89			
1	14	1	2	0,94			
	\bar{x}	1,18	15,27	0,07	2,02		
Límites extremos			0 - 6	4 - 20	0 - 1	0 - 8	

Tabla 31: Configuraciones meióticas del híbrido (*Zea mays* x *Zea diploperennis*) x *Zea luxurians* (MDL) con 2n=20

Híbrido	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
MDL	20	166	0	10	0	0	68.30
			2	9	0	0	24.34
			4	8	0	0	6.12
			6	7	0	0	0.62
			0	8	0	1	0.62
			\bar{x}	0.78	9.54	0	0.02
Límites extremos			0 - 6	7 - 10		0 - 1	

Tabla 32: Configuraciones meióticas del trihíbrido *Zea mays* con 2n=40 por *Zea diploperennis* x *Zea perennis* con 2n=40 (MDP) teniendo el trihíbrido un número cromosómico de 2n=40

Híbrido	2n	Número de células	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
			I	II	III	IV	
MDP	40	162	0	10	0	5	43,93
			0	12	0	4	24,98
			0	14	0	3	15,47
			0	16	0	2	2,40
			0	18	0	1	2,40
			0	6	0	7	2,40
			1	10	1	4	1,80
			2	11	0	4	2,40
			2	9	0	5	3,00
			1	12	1	3	1,20
			\bar{x}	0,04	10,91	0,06	4,50
Límites extremos			0 - 4	6 - 18	0 - 1	1 - 7	

Tabla 33: Promedio de univalentes (I), bivalentes (II), trivalentes (III), tetravalentes (IV), quiasmas, fertilidad del polen y de la semilla en especies e híbridos del Género *Zea*.

Especie o híbrido	2n	Configuraciones meióticas				Quiasmas (%)	Fertilidad (%)	
		I	II	III	IV		Polen	Semilla
Zm20	20		10.00			14.00	99	99
Zmex	20	0.06	9.97			16.48	99	98
Zpar	20	0.46	9.76			15.36	94	91
Zl	20	0.44	9.78			15.34	95	90
Zd	20	0.27	9.73			14.00	97	92
ZmxZ mex	20	0.18	9.91			16.75	99	98
ZmxZpar20	20	0.23	9.56	0.05	0.15	15.42	96	90
ZmxZl	20	0.99	9.50			15.48	92	89
ZmxZd20	20	0.76	9.62			15.00	92 - 95	94
ZdxZl	20	0.55	9.61			15.26	94	90
MDL	20	0.78	9.54		0.02	14.57	60 - 80	72
ZmxZm30	30	2.65	2.56	7.41		28.12	11 - 55	0
ZmxZpar30	30	5.97	5.93	4.05		25.60	40 - 80	15
ZmxZp30	30	5.07	5.39	4.71		23.06	3 - 5	1
ZpxZmex	30	5.27	5.50	4.58		24,02	15 - 36	2
ZlxZp	30	5.57	5.02	4.71		21,36	4 - 5	1
ZdxZp30	30	5.45	5.42	4.47		17.25	37 - 83	2
Zm40	40	0.04	3.24	0.04	8.34	33.75	80	60
Zp	40	0.10	11.01	0.01	4.70	34.56	89 - 92	70
ZmxZp40	40	0.20	11.62	0.03	4.12	33.59	50 - 90	60 - 80
ZdxZp40	40	0.24	11.29	0.06	4.20	31.42	56	80
ZparxZd40	40	1.18	15.27	0.07	2.02	28.20	70	60
MDP	40	0.04	10.91	0.01	4.50	33.81	92	90

Zm20: *Zea mays* con 2n=20; **Zmex:** *Zea mexicana*; **Zpar:** *Zea parviglumis*; **Zl:** *Zea luxurians*; **Zd:** *Zea diploperennis*; **ZmxZmex:** *Zea mays* x *Zea mexicana*; **ZmxZpar20:** *Zea mays* por *Zea parviglumis* con 2n=20; **ZmxZl:** *Zea mays* x *Zea luxurians*; **ZmxZd20:** *Zea mays* x *Zea diploperennis* con 2n=20; **ZdxZl:** *Zea diploperennis* x *Zea luxurians*; **MDL:** Trihíbrido entre *Zea mays*, *Zea diploperennis* y *Zea luxurians*; **ZmxZm30:** Híbrido entre maíces de distinto nivel de ploidía; **ZmxZpar30:** *Zea mays* x *Zea parviglumis* con 2n=30; **ZmxZp30:** *Zea mays* x *Zea perennis* con 2n=30; **ZpxZmex:** *Zea perennis* x *Zea mexicana*; **ZlxZp:** *Zea luxurians* x *Zea perennis*; **ZdxZp30:** *Zea diploperennis* x *Zea perennis* con 2n=30; **Zm40:** *Zea mays* con 2n=40; **Zp:** *Zea perennis*; **ZmxZp40:** *Zea mays* x *Zea perennis* con 2n=40; **ZdxZp40:** *Zea diploperennis* x *Zea perennis* con 2n=40; **ZparxZd40:** *Zea parviglumis* x *Zea diploperennis* con 2n=40; **MDP:** Trihíbrido entre *Zea mays*, *Zea diploperennis* y *Zea perennis*.

Tabla 34: Configuraciones meióticas más frecuentes en especies e híbridos del Género *Zea*.

Especie o híbrido	2n	Configuraciones en diacinesis-metafase I				%
		I	II	III	IV	
Zm20	20	0	10	0	0	100,00
Zmex	20	0	10	0	0	97,00
Zpar	20	0	10	0	0	81,76
Zl	20	0	10	0	0	82,00
Zd	20	0	10	0	0	73,00
ZmxZmex	20	0	10	0	0	90,77
ZmxZpar20	20	0	10	0	0	74,27
ZmxZl	20	0	10	0	0	63,48
ZmxZd20	20	0	10	0	0	69,06
ZdxZl	20	0	10	0	0	75,50
MDL	20	0	10	0	0	68,30
ZmxZm30	30	2	2	8	0	41,25
ZmxZpar30	30	5	5	5	0	29,68
ZmxZp30	30	5	5	5	0	53,57
ZpxZmex	30	5	5	5	0	54,95
ZlxZp	30	5	5	5	0	27,00
ZdxZp30	30	5	5	5	0	56,58
Zm40	40	0	0	0	10	30,28
Zp	40	0	10	0	5	54,47
ZmxZp40	40	0	10	0	5	27,23
ZdxZp40	40	0	10	0	5	31,78
ZparxZd40	40	0	16	0	2	16,04
MDP	40	0	10	0	5	43,93

Zm20: *Zea mays* con 2n=20; **Zmex:** *Zea mexicana*; **Zpar:** *Zea parviglumis*; **Zl:** *Zea luxurians*; **Zd:** *Zea diploperennis*; **ZmxZmex:** *Zea mays* x *Zea mexicana*; **ZmxZpar20:** *Zea mays* por *Zea parviglumis* con 2n=20; **ZmxZl:** *Zea mays* x *Zea luxurians*; **ZmxZd20:** *Zea mays* x *Zea diploperennis* con 2n=20; **ZdxZl:** *Zea diploperennis* x *Zea luxurians*; **MDL:** Trihíbrido entre *Zea mays*, *Zea diploperennis* y *Zea luxurians*; **ZmxZm30:** Híbrido entre maíces de distinto nivel de ploidía; **ZmxZpar30:** *Zea mays* x *Zea parviglumis* con 2n=30; **ZmxZp30:** *Zea mays* x *Zea perennis* con 2n=30; **ZpxZmex:** *Zea perennis* x *Zea mexicana*; **ZlxZp:** *Zea luxurians* x *Zea perennis*; **ZdxZp30:** *Zea diploperennis* x *Zea perennis* con 2n=30; **Zm40:** *Zea mays* con 2n=40; **Zp:** *Zea perennis*; **ZmxZp40:** *Zea mays* x *Zea perennis* con 2n=40; **ZdxZp40:** *Zea diploperennis* x *Zea perennis* con 2n=40; **ZparxZd40:** *Zea parviglumis* x *Zea diploperennis* con 2n=40; **MDP:** Trihíbrido entre *Zea mays*, *Zea diploperennis* y *Zea perennis*.

Tabla 35: Comparación del tamaño de los cromosomas de las especies de *Zea* con $2n=20$ y los de *Zea perennis*, considerando en esta última especie como si fuese un solo cromosoma a los pares cromosómico 1-2; 3-4; 7-8; 9-10 y 15-16 por tener igual tamaño y relación entre los brazos (Tabla 5 y 6).

Cromosoma	Zm	Zmex	Zpar	Zl	Zd	Zp
1	82,40	83,20	89,30	79,20	75,65	86,18
2	66,50	74,10	82,94	76,80	75,00	67,12
3	58,78	62,30	74,20	66,80	71,62	66,54
4	62,00	59,20	65,48	65,19	67,17	62,79
5	59,82	58,48	56,60	62,10	61,51	61,94
6	48,73 O.N.	47,30 O.N.	49,90 O.N.	46,22 O.N.	44,97 O.N.	57,09
7	46,73	46,52	46,38	48,90	47,79	56,93
8	41,78	45,66	43,22	47,10	45,88	53,98
9	43,24	43,80	41,66	44,00	44,25	50,98 O.N.
10	36,93	35,96	37,97	37,50	35,77	50,00 O.N.
11						47,08
12						43,35
13						36,17
14						29,06
15						23,51

Especies parentales: **Zm:** *Zea mays*; **Zmex:** *Zea mexicana*; **Zpar:** *Zea parviglumis*; **Zl:** *Zea luxurians*; **Zd:** *Zea diploperennis*; **Zp:** *Zea perennis*.

Tabla 36: Comparación de la relación entre los brazos de los cromosomas de especies de *Zea* con $2n=20$ y los de *Zea perennis*, considerando en esta última especie como si fuese un solo cromosoma a los pares cromosómico 1-2; 3-4; 7-8; 9-10 y 15-16 por tener igual tamaño y relación entre los brazos (Tabla 5 y 6).

Cromosoma	Zm	Zmex	Zpar	Zl	Zd	Zp
1	1,30	1,31	1,29	1,41	1,07	1,21
2	1,25	1,26	1,17	1,12	1,11	8,40
3	2,00	2,07	1,98	1,80	1,27	1,03
4	1,60	1,47	1,54	2,21	2,78	2,61
5	1,10	3,44	3,52	3,92	3,52	6,29
6	7,10	6,74	6,22	6,60	6,20	2,53
7	2,80	2,76	2,24	2,54	2,18	1,74
8	3,20	3,92	4,10	4,22	4,00	4,40
9	1,80	1,76	1,79	1,74	1,41	4,54
10	2,80	3,6	3,42	3,49	3,66	4,89
11						4,05
12						2,00
13						1,57
14						1,87
15						1,50

Especies parentales: **Zm:** *Zea mays*; **Zmex:** *Zea mexicana*; **Zpar:** *Zea parviglumis*; **Zl:** *Zea luxurians*; **Zd:** *Zea diploperennis*; **Zp:** *Zea perennis*.

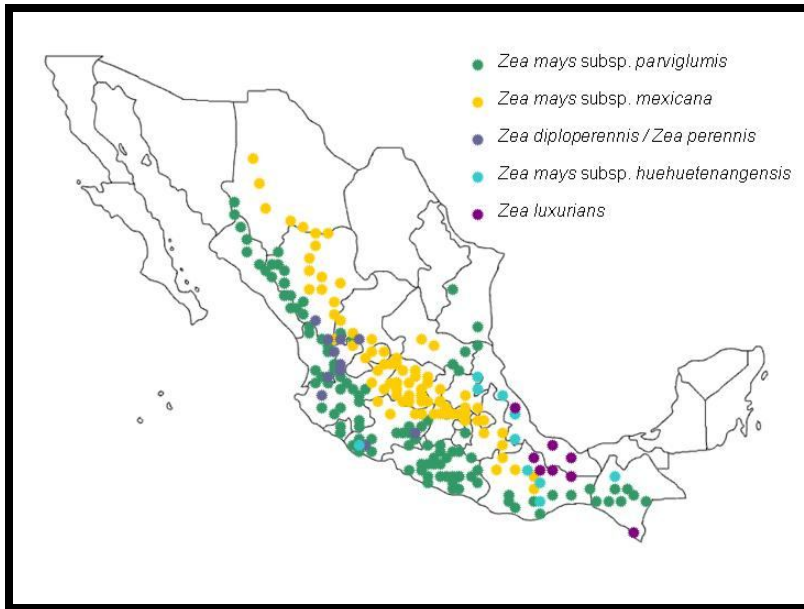


Figura 1: Distribución geográfica de los Teosintes en Méjico



Figura 2: a) espiga de maíz,
b) espiga dística de teosinte.

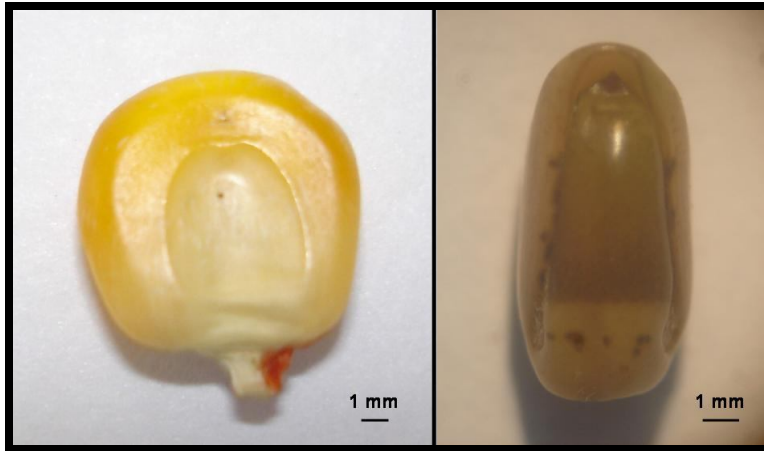


Figura 3: a) grano de maíz, b) cariópse de Teosinte

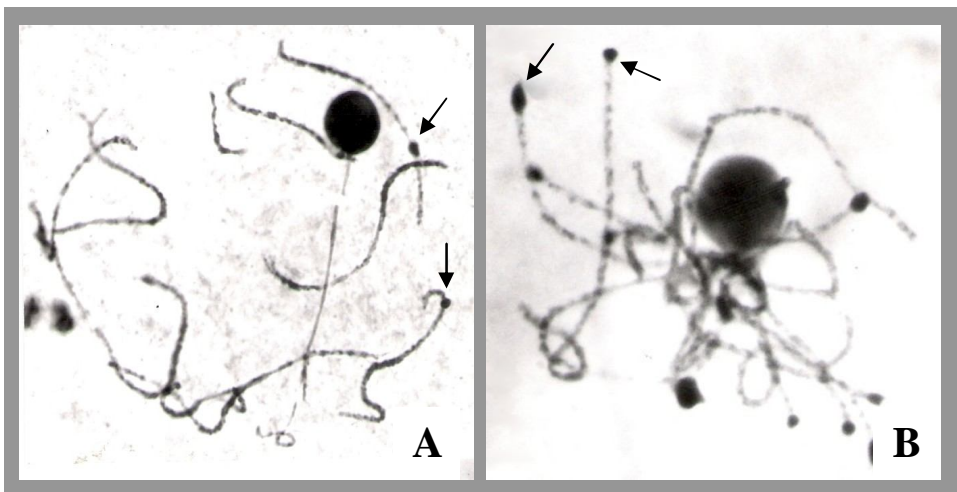


Figura 4: Cromosomas en paquíteno observándose la posición de los *knobs* en especies del Género *Zea*: A) *Knobs* subterminales en *Zea mays*; B) *Knobs* terminales en Teosinte.



Figura 5: Especies del Género *Zea*: A) *Zea mays*; B) *Zea mexicana*; C) *Zea parviglumis*; D) *Zea luxurians*; E) *Zea diploperennis*; F) *Zea perennis*

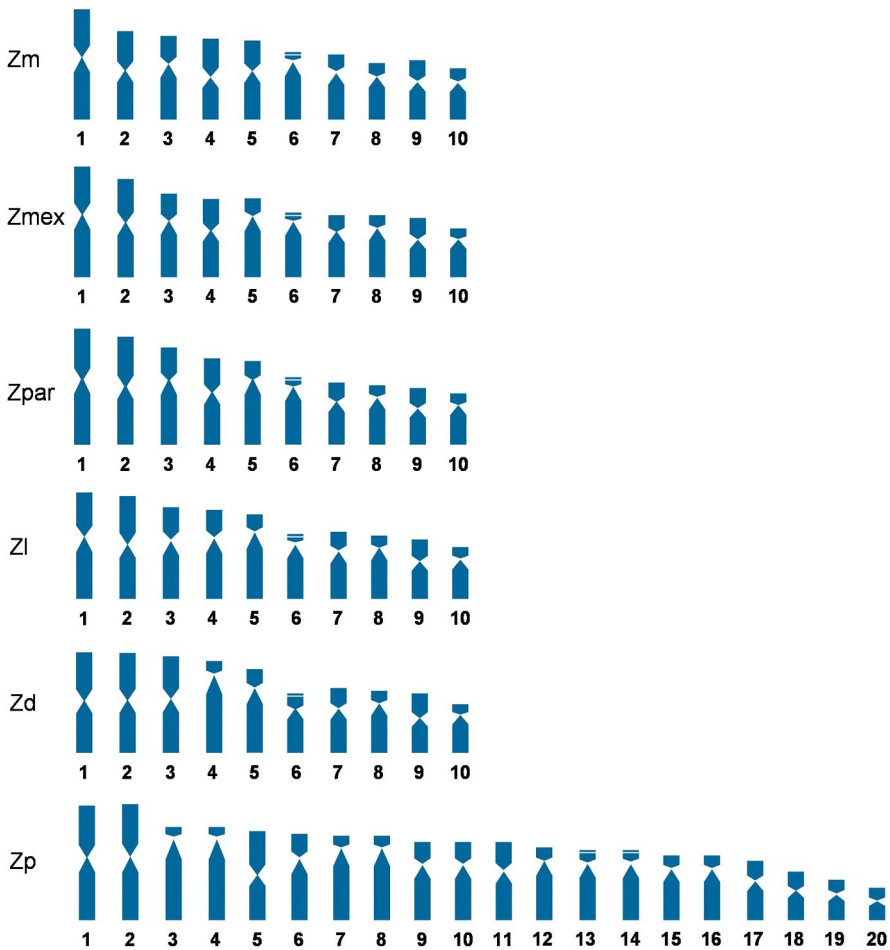


Figura 6: Cariotipo de las distintas especies de *Zea* comparando la longitud total de los cromosomas y la relación entre sus brazos. Los cromosomas con una marca en el brazo corto son los organizadores del nucleolo.

Especies: **Zm:** *Zea mays*; **Zmex:** *Zea mexicana*; **Zpar:** *Zea parviglumis*; **Zl:** *Zea luxurians*; **Zd:** *Zea diploperennis*; **Zp:** *Zea perennis*.

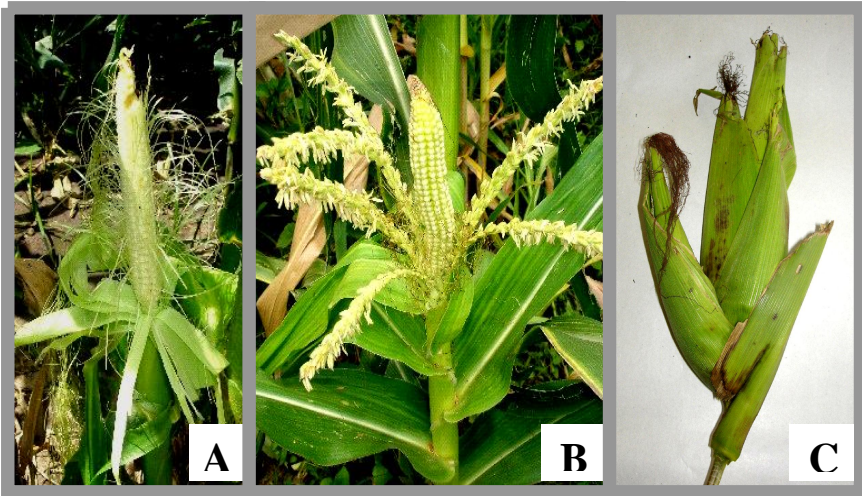


Figura 7: Plantas de maíz con anomalías en la panoja y la espiga; A) Espiga en lugar de la panoja, B) Espiga y panoja simultáneas, C) Varias espigas en el mismo nudo reproductivo.

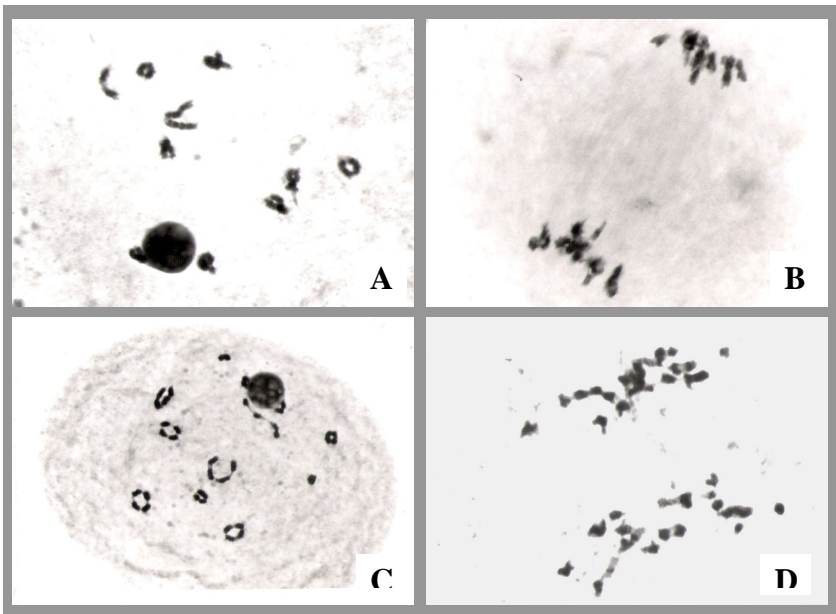


Figura 8: Configuraciones meióticas de *Zea mays* con $2n=20-40$: A) Cromosomas separados en dos grupos de 5 cromosomas cada uno; B) Anafase normal en *Z. mays* con $2n=20$; C) *Z. mays* con $2n=40$ se observan $8IV+4II$; D) Anafase normal en *Z. mays* con $2n=40$.

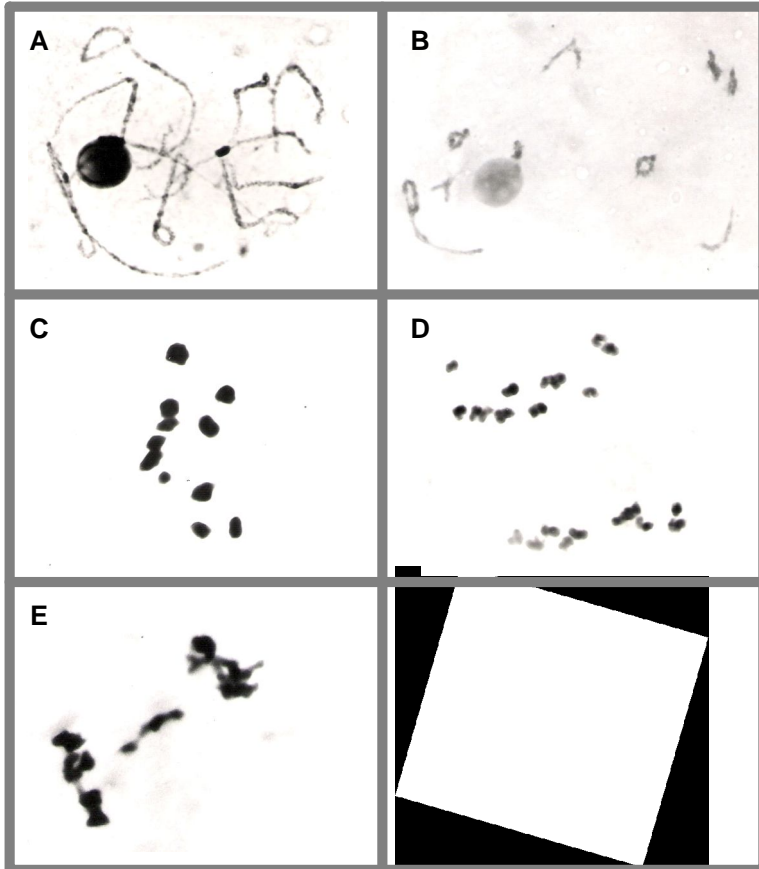


Figura 9: Configuraciones meióticas de *Zea mexicana*:
 A) Cromosomas en paquiteno; B) cromosomas separados en dos grupos de 5 cromosomas; C) Configuración meiótica de 9II+2I; D) Anafase normal; E) Anafase con un puente de inversión; F) Anafase con cromosomas retrasados

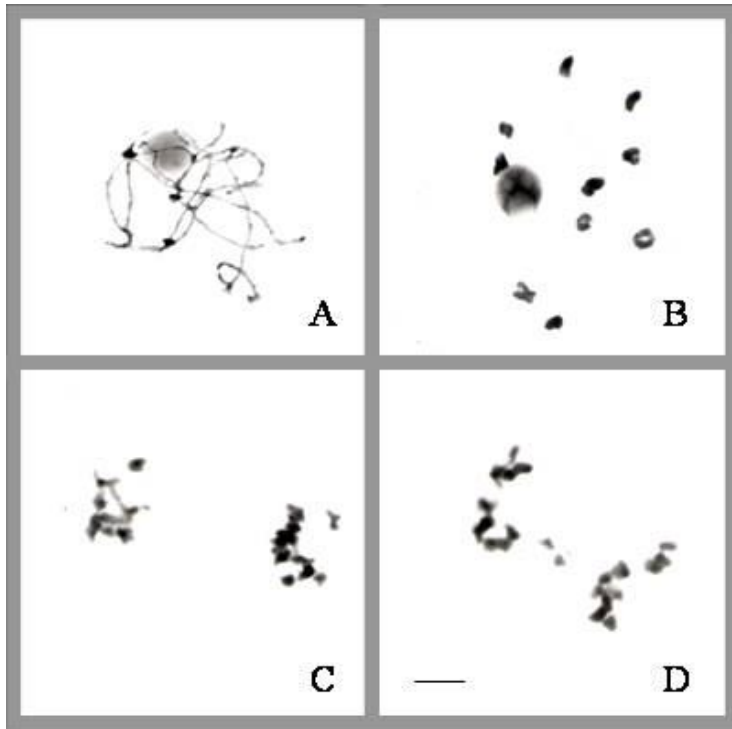


Figura 10: Configuraciones meióticas de *Z. diploperennis*; A) Cromosomas en paquíteno, B) 10II, C) Anafase normal, D) Anafase con cromosomas retrasados. Barra = 10 micrones

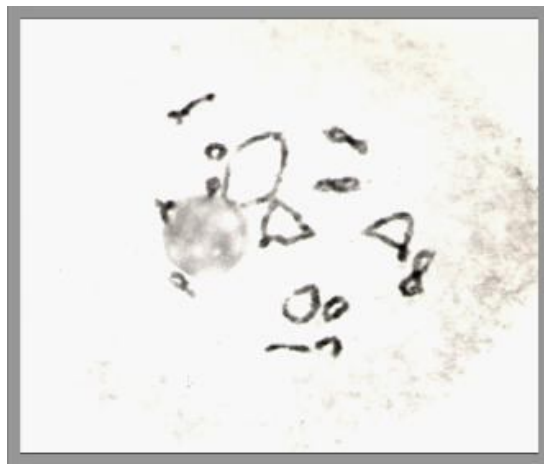


Figura 11 : célula de *Zea perennis* en paquíteno observándose 10II + 5IV con dos cromosomas organizadores del nucleolo

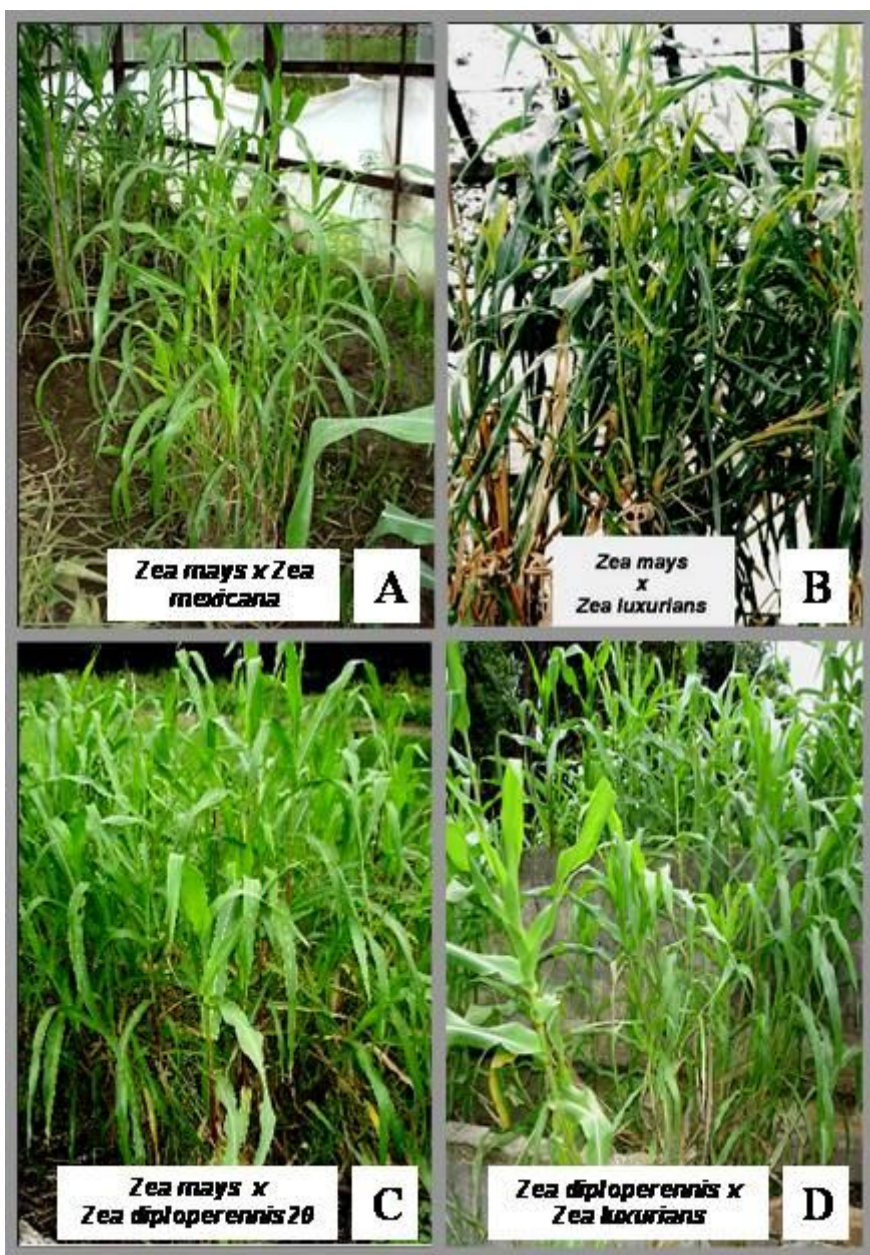


Figura 12: Plantas de híbridos con $2n=20$: A) *Z. mays* x *Z. mexicana*; B) *Z. mays* x *Z. luxurians*; C) *Z. mays* x *Z. diploperennis* con $2n=20$; D) *Z. diploperennis* x *Z. luxurians*.

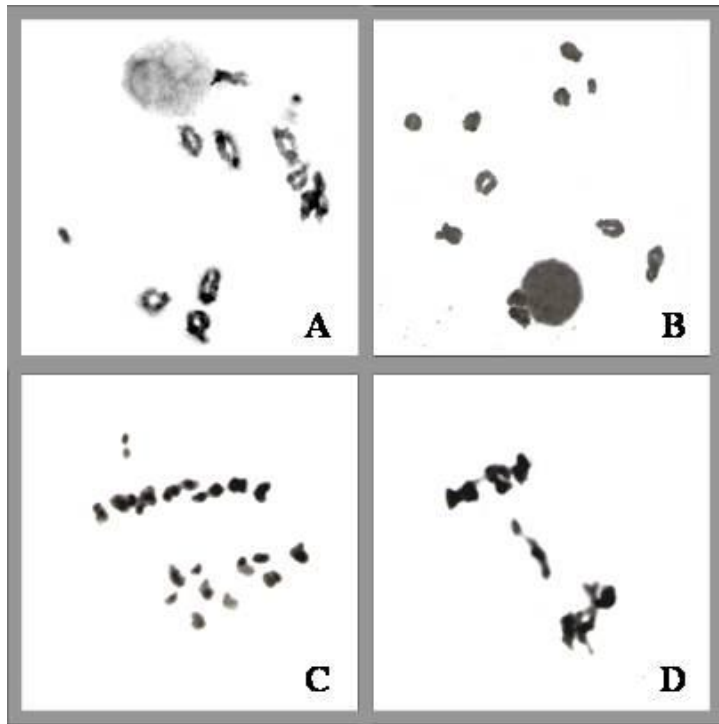


Figura 13: Configuraciones meiótica del híbrido *Z. mays* x *Z. mexicana*: A) 10II; B) 9II+2I; C) Anafase normal; D) Anafase con puente de inversión.

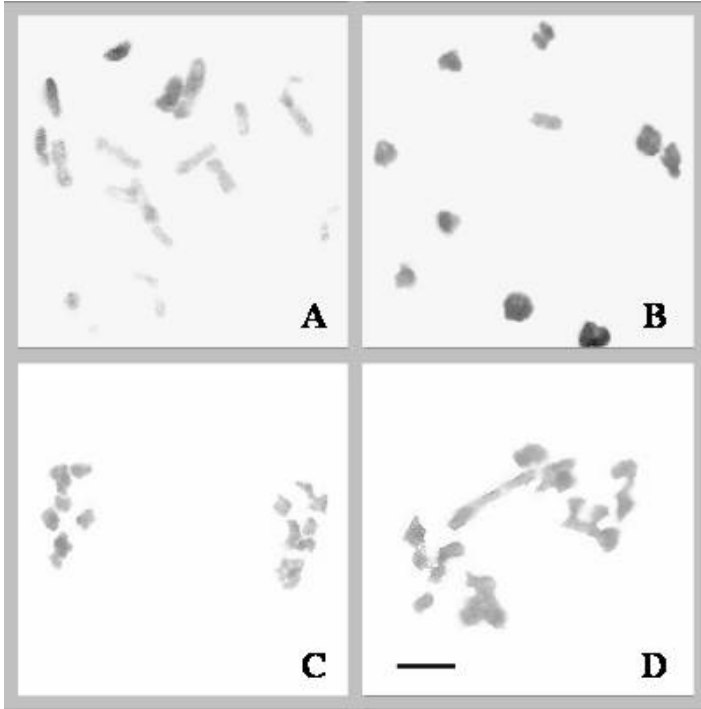


Figura 14 : Configuraciones meióticas del híbrido *Z. mays* x *Z. diploperennis* con $2n=20$: A) cromosomas mitóticos con $2n=20$; B) 10II; C) anafase normal; D) anafase con puente de inversión

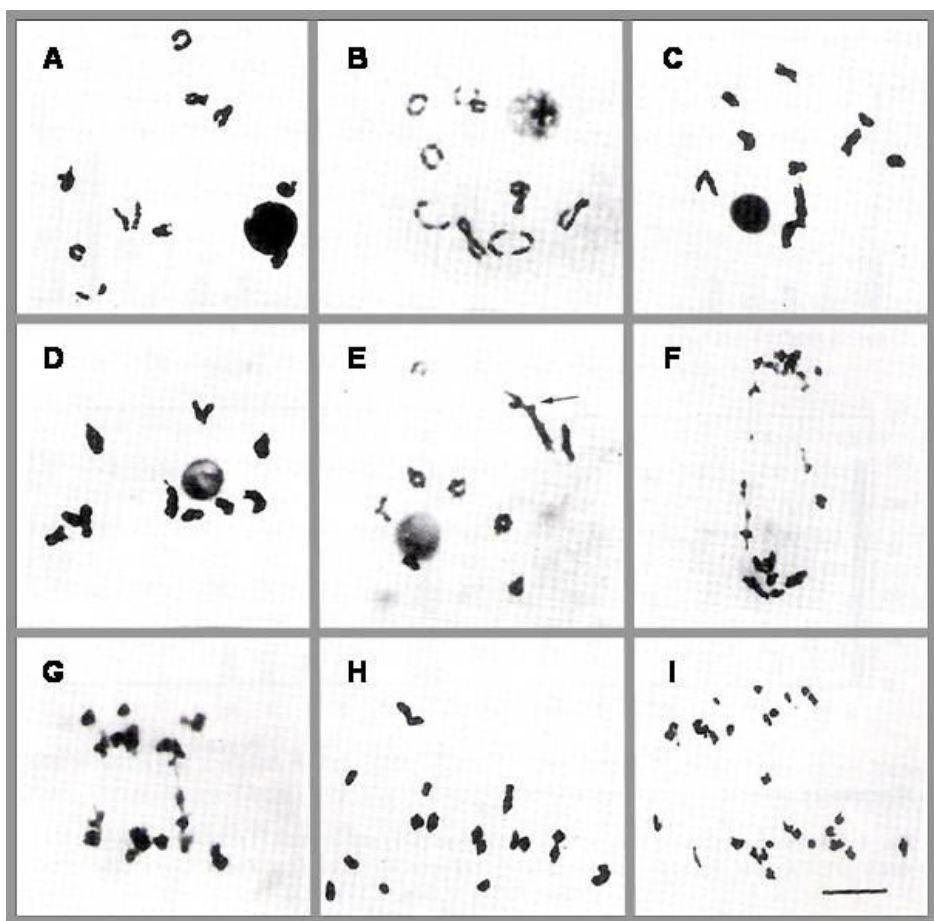


Figura 15: Configuraciones meióticas en diacinesis-metáfase I de los híbridos entre *Z.mays* x *Z. parviglumis* con $2n=20$ y *Z.mays* x *Z. parviglumis* con $2n=30$: A) *Z.mays* con $2n=20$ (10II), B) *Z.mays* con $2n=40$ (10IV), C) *Z. parviglumis* (10II), D) *Z.mays* x *Z. parviglumis* con $2n=20$ (10II), E) *Z.mays* x *Z. parviglumis* con $2n=20$ (8II+1IV), F) Anafase con cromosomas retrasados en *Z.mays* x *Z. parviglumis* con $2n=20$, G) Anafase con un puente de inversión en *Z.mays* x *Z. parviglumis* con $2n=20$, H) *Z.mays* x *Z. parviglumis* con $2n=30$ (5III+5II+5I), I) Anafase del híbrido *Z.mays* x *Z. parviglumis* con $2n=30$ migrando distinto número de cromosomas hacia cada polo.

Escala=10 μ m.

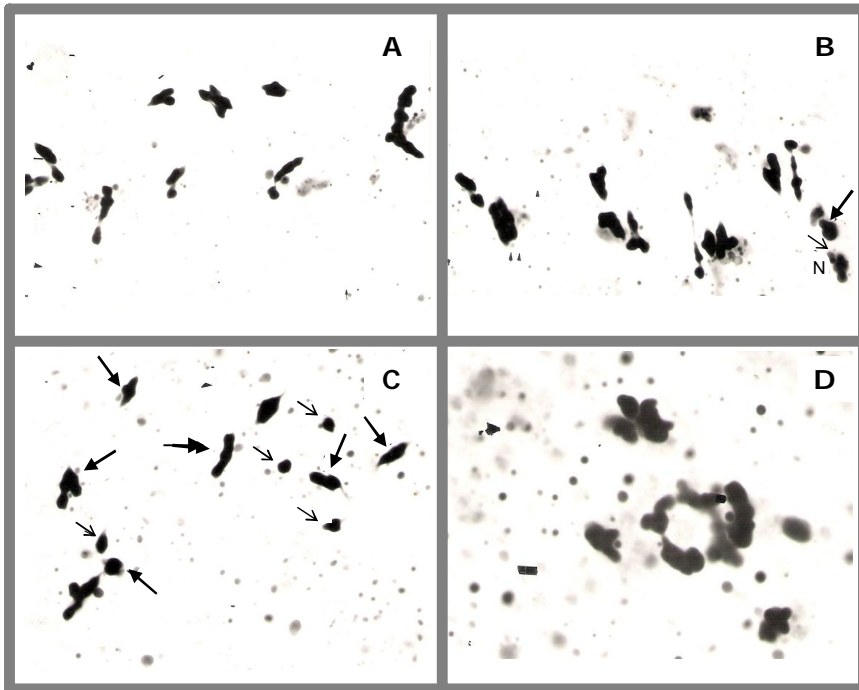


Figura 16: Configuraciones meióticas de *Zea mays* ssp *mays* con $2n=30$: A) Metafase con 10 trivalentes; B) Metafase con 9 trivalentes (\rightarrow) 1 bivalente y 1 univalente (\rightarrow). Se observa un cromosoma que forma un pequeño nucleolo (N). C) metafase con 6 trivalentes, 4 bivalentes y 4 univalentes. D) metafase con numerosos nucleolitos.



Figura 17: Híbridos del Género *Zea* con $2n=30$: A) *Z. mays* x *Z. perennis*; B) *Z. parviglumis* x *Z. perennis*

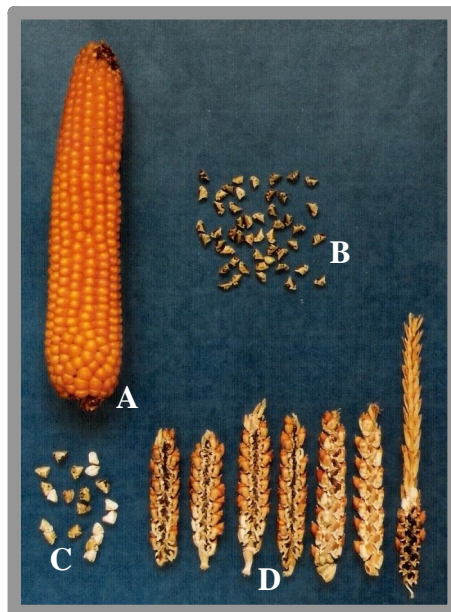


Figura 18: A) Espiga de maíz, B) Cariopses de *Z. perennis*; C) F1 de *Z. mays* x *Z. perennis* con $2n=30$; D) F1 de *Z. mays* por *Z. perennis* con $2n=40$



Figura 19: Clorantia en F1 de *Z. mays* x *Z. perennis* con $2n=30$

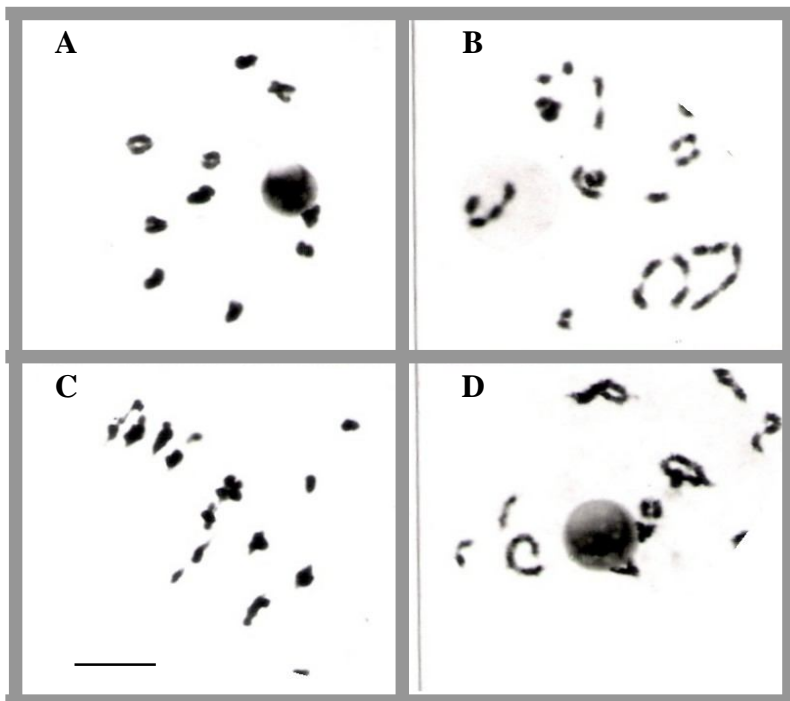


Figura 20: Configuraciones meióticas observadas en diacinesis metafase I en: A) *Z. mays* con $2n=20$ (10II); B) *Z. perennis* (51V+10II); C) *Z. mays* x *Z. perennis* con $2n=30$ (5III+5II+5I); D) *Z. mays* x *Z. perennis* con $2n=40$ (5IV+10II). Escala 10 μ m.

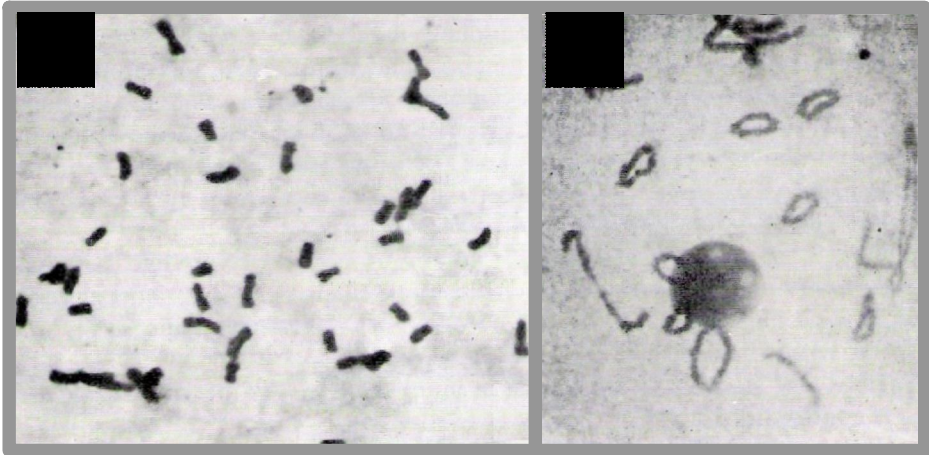


Figura 21: Híbrido de *Zea diploperennis* x *Zea perennis* con $2n=40$:
A) cromosomas mitóticos; B) 10II+5IV.



Fig. 22: Híbrido *Zea parviglumis* x *Zea diploperennis* con $2n=40$

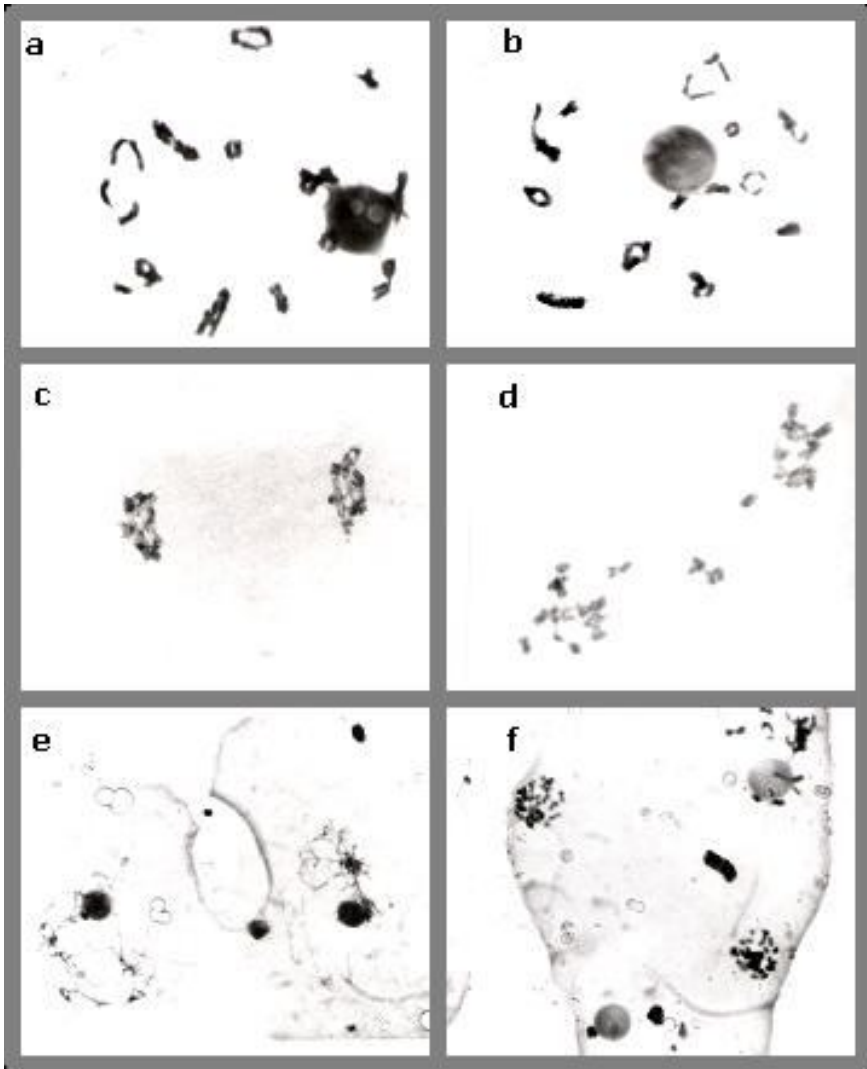


Figura 23: Configuraciones meióticas del híbrido *Z. parviglumis* x *Z. diploperennis* con $2n=40$: **a)** 10II+5IV, **b)** 12II+4IV, **c)** anafase normal, **d)** anafase con cromosomas retrasados, **e** y **f)** células en distintos estadios de división meiótica permaneciendo unidas por los citoplasmas.



Figura 24: Especies e híbridos de *Zea*: A) espigas de *Z. mays*; *Z. diploperennis* y su híbrido, B) Inflorescencias femeninas del híbrido *Z. mays* x *Z. diploperennis*, *Z. luxurians* y el trihíbrido MDL (*Z. mays* x *Z. diploperennis*) x *Z. luxurians*.

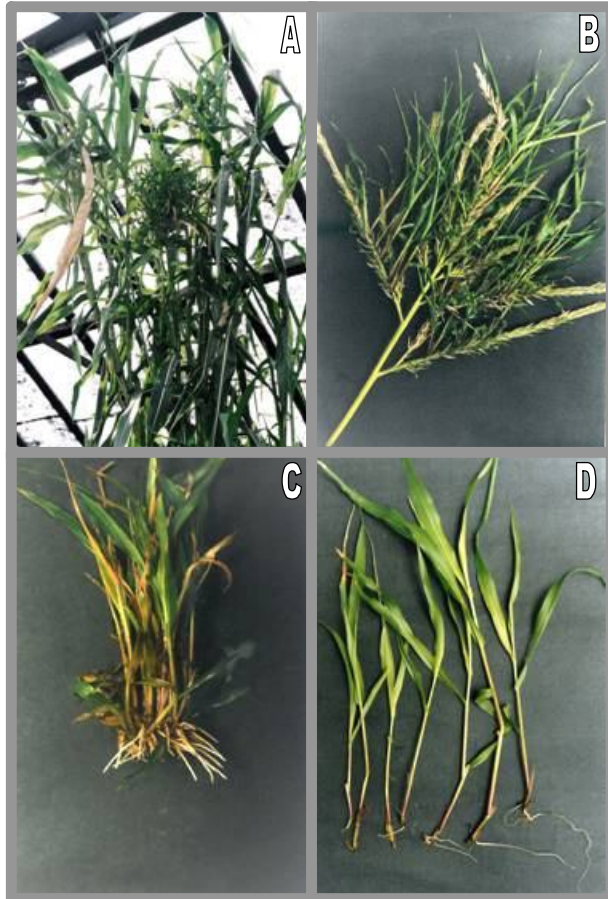


Figura 25: Trihíbrido MDP [(*Z. mays* x *Z. diploperennis*) x *Z. luxurians*]; A) plantas con clorantia en la panoja; B) panoja con clorantia, C) panoja con plántulas emitiendo raíces, D) plántulas de la panoja con igual genotipo que la planta madre.

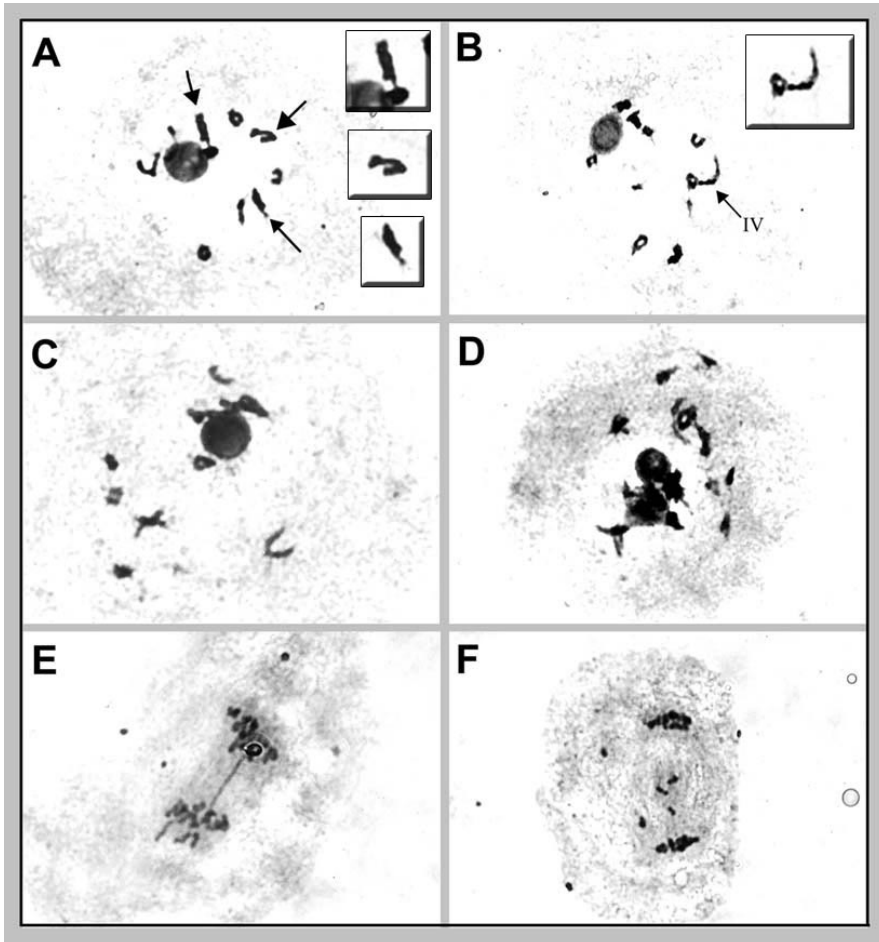


Figura 26: Configuraciones meióticas del trihíbrido MDL, [(*Z. mays* x *Z. diploperennis*) x *Z. luxurians*]: A) 10 II, tres de los bivalentes con diferente tamaño; B) 8II+1IV; C) cromosomas con asociación secundaria; D) célula con el número cromosómico duplicado; E) anafase I con puente de inversión; F) anafase con cromosomas retrasados.

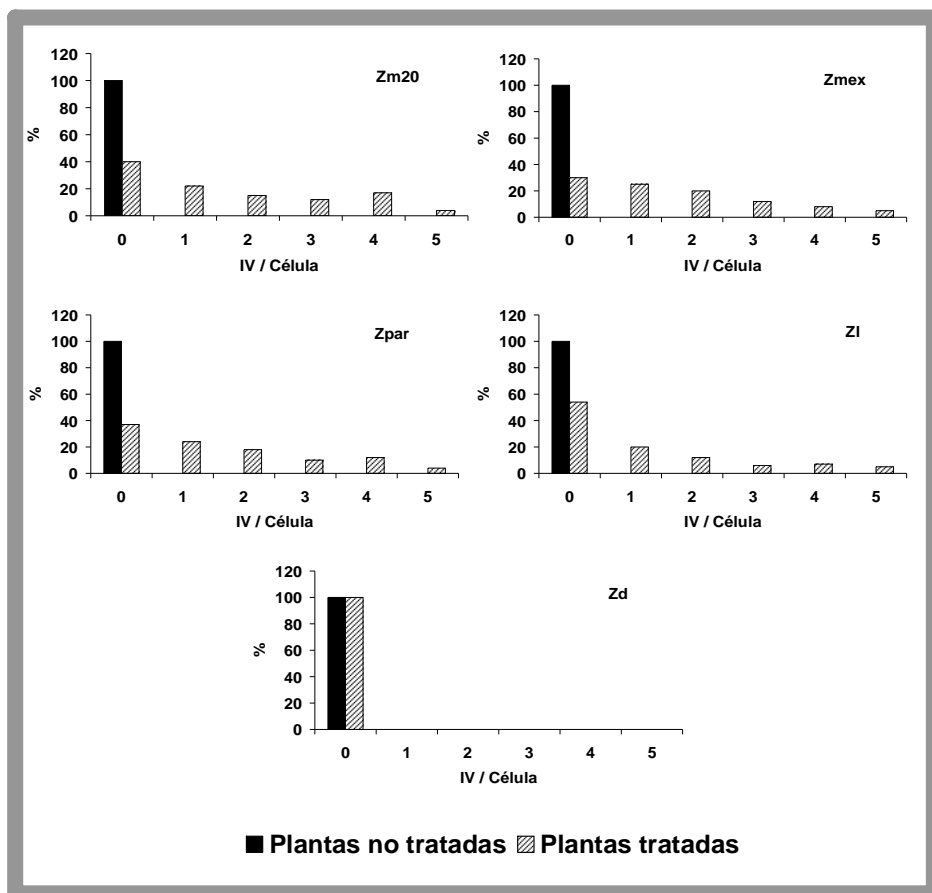


Figura 27: Porcentaje de tetraivalentes por células observados en especies parentales con $2n=20$ tratadas con solución diluida de colchicina ($0,5 \times 10^{-4}M$) y el testigo sin tratar.

Especies: **Zm:** *Zea mays*; **Zmex:** *Zea mexicana*; **Zpar:** *Zea parviglumis*; **Zl:** *Zea luxurians*; **Zd:** *Zea diploperennis*

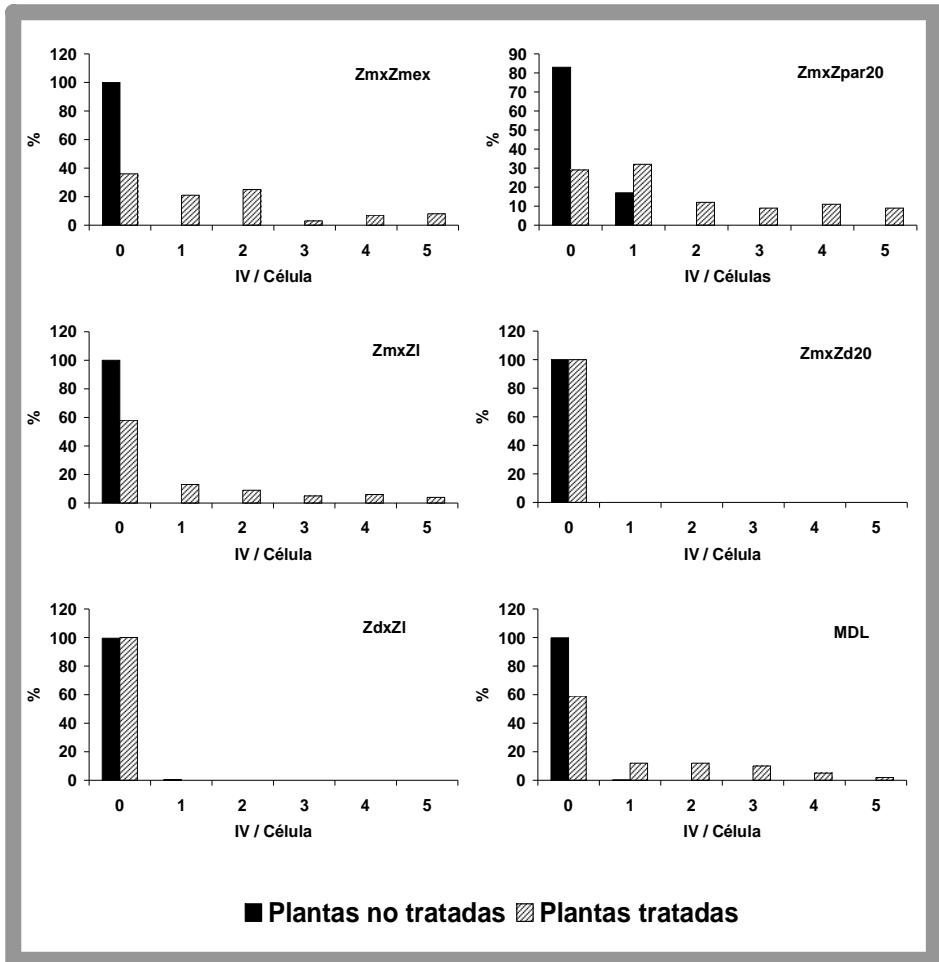


Figura 28: Porcentaje de cuadrivalentes por células observados en híbridos de *Zea* con $2n=20$ tratadas con solución diluida de colchicina ($0,5 \times 10^{-4}M$) y el testigo sin tratar.

Híbridos: **ZmxZmex:** *Zea mays* x *Zea mexicana*; **ZmxZpar20:** *Zea mays* por *Zea parviglumis* con $2n=20$; **ZmxZI:** *Zea mays* x *Zea luxurians*; **ZmxZd20:** *Zea mays* x con $2n=20$; **ZdxZI:** *Zea diploperennis* x *Zea luxurians*; **MDL:** Trihíbrido entre *Zea mays*, *Zea diploperennis* y *Zea luxurians*.

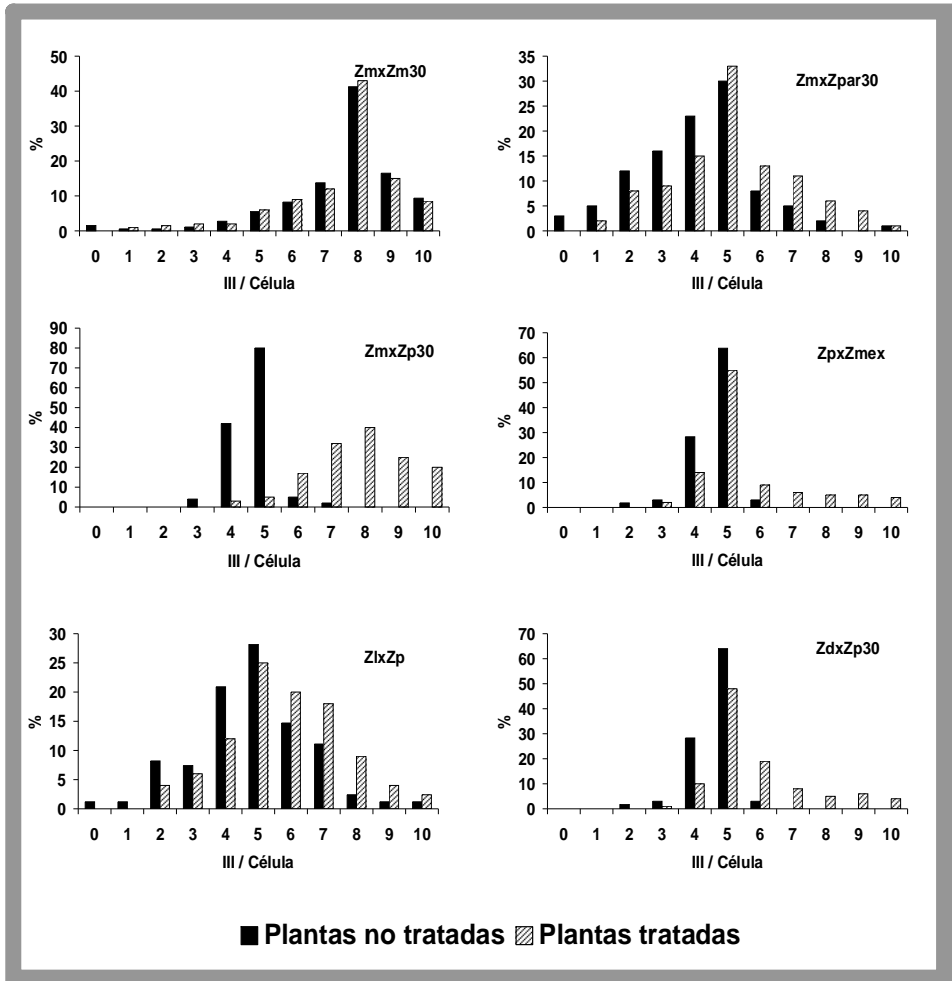


Figura 29: Porcentaje de trivalentes por células observados en híbridos de *Zea* con $2n=30$ tratadas con solución diluida de colchicina ($0,5 \times 10^{-4}M$) y el testigo sin tratar.

Híbridos: **ZmxZm30:** Híbrido entre maíces de distinto nivel de ploidía; **ZmxZpar30:** *Zea mays* x *Zea parviglumis* con $2n=30$; **ZmxZp30:** *Zea mays* x *Zea perennis* con $2n=30$; **ZpxZmex:** *Zea perennis* x *Zea mexicana*; **ZlxZp:** *Zea luxurians* x *Zea perennis*; **ZdxZp30:** *Zea diploperennis* x *Zea perennis* con $2n=30$

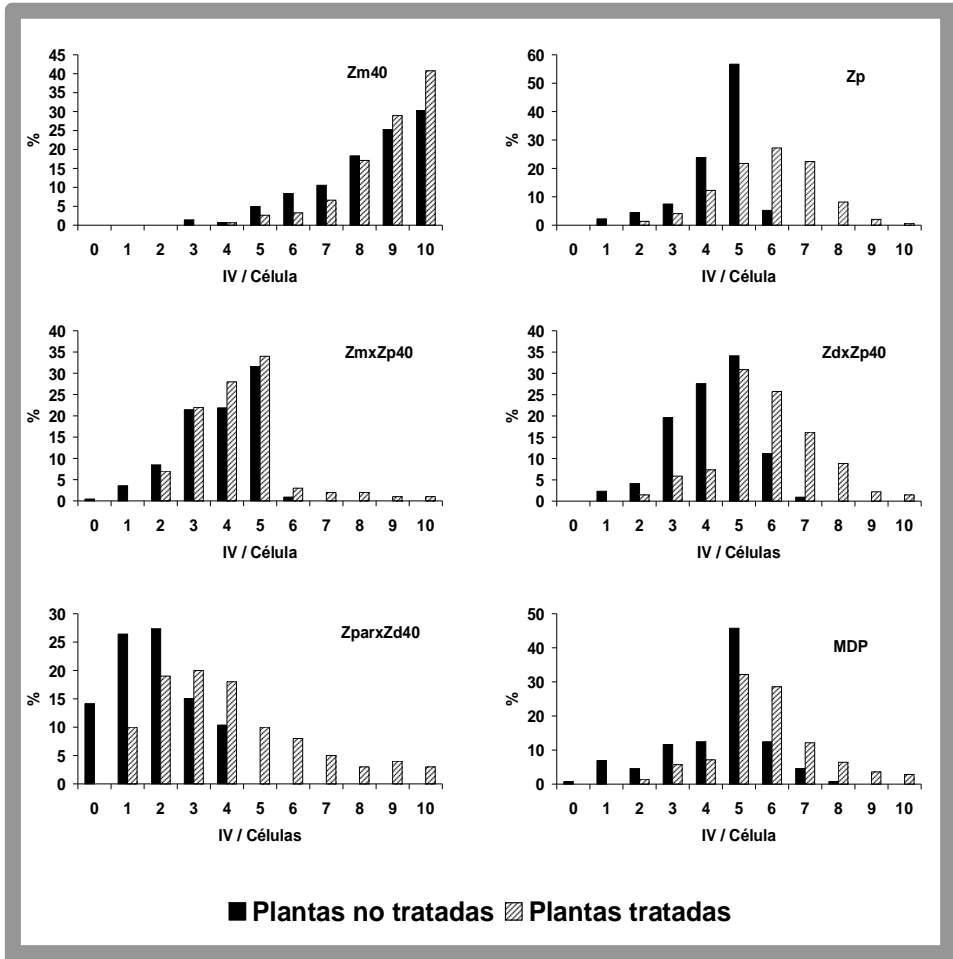


Figura 30: Porcentaje de tetraivalentes por células observados en especies parentales e híbridos de *Zea* con $2n=40$ tratados con solución diluida de colchicina ($0,5 \times 10^{-4}M$) y el testigo sin tratar.

Zm40= *Zea mays* con $2n=40$; **Zp**=*Zea perennis*; **ZmxZp40**=*Zea mays* x *Zea perennis* con $2n=40$; **ZdxZp40**=*Zea diploperennis* x *Zea perennis* con $2n=40$; **ZparxZd40**=*Zea parviglumis* x *Zea diploperennis* con $2n=40$; **MDP**= trihíbrido entre *Zea mays* x *Zea diploperennis* x *Zea perennis* con $2n=40$.

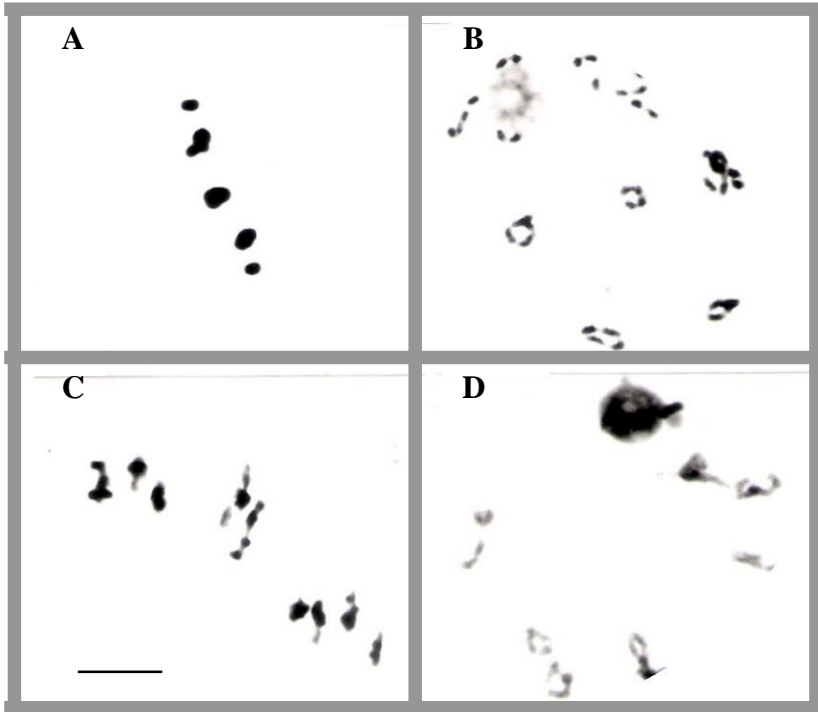


Figura 31: Configuraciones meióticas inducidas por el tratamiento con colchicina en: A) *Z. mays* con $2n=20$ (5V); B) *Zea perennis* (81V + 4II); C) *Z. mays* x *Zea perennis* con $2n=30$ (10III); D) *Z. mays* x *Zea perennis* con $2n=40$ (9IV + 2II). Escala 10 μm .

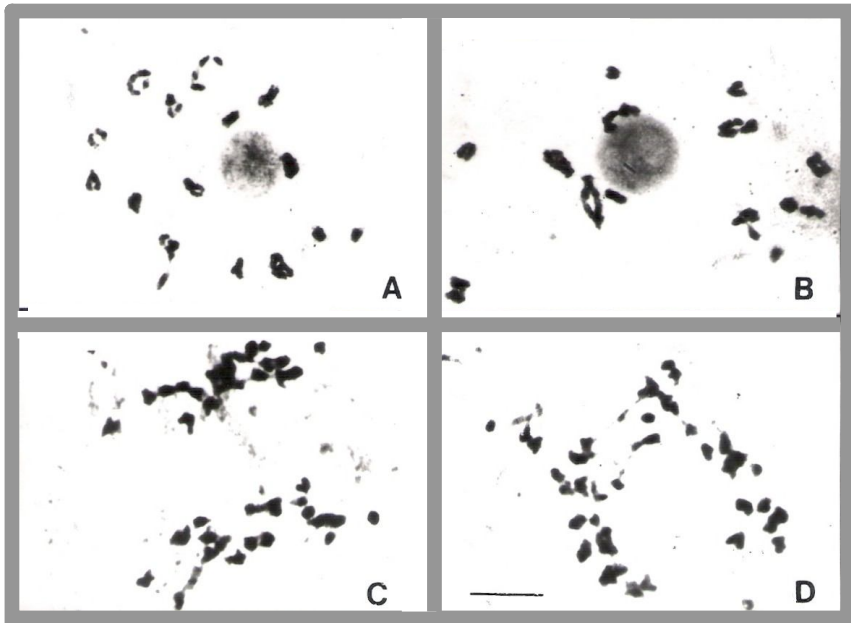


Figura 32: Configuraciones meióticas del trihíbrido *Zea mays*, *Zea diploperennis* y *Zea perennis*: A) Diacinesis con 5IV+10II; B) Diacinesis tratada con colchicina con 8IV+4II; C) Anafase I normal; D) Anafase I con puentes de inversión. Escala = 10 μ m.

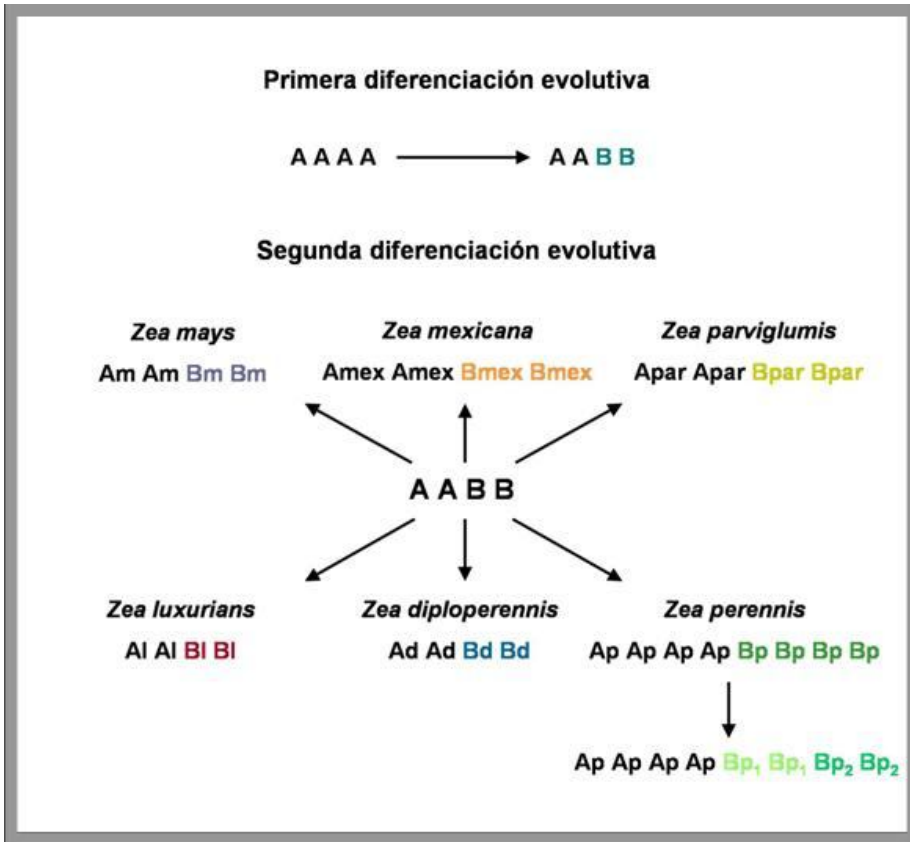
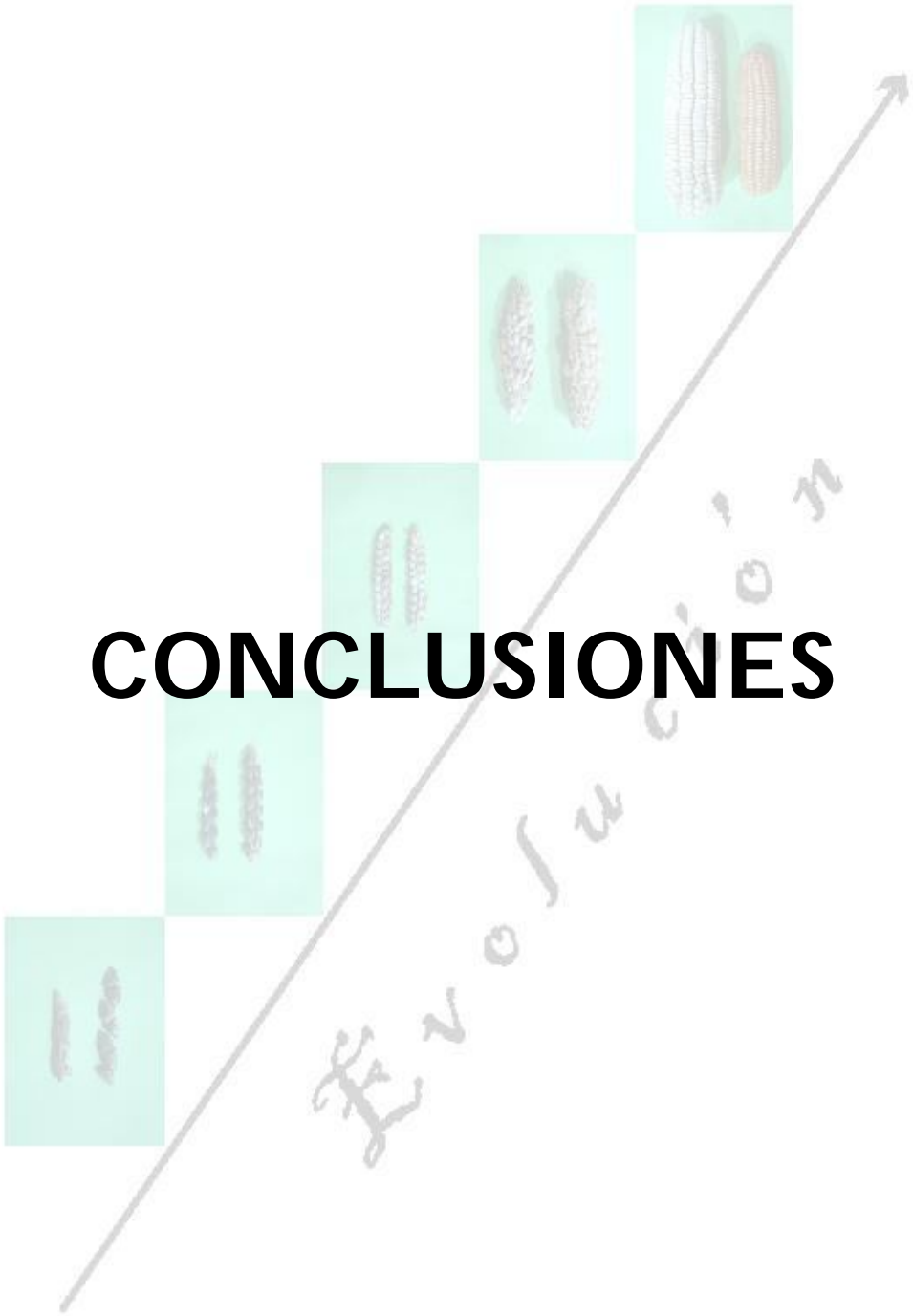


Figura 33: Posible mecanismo de diferenciación de los cromosomas de *Zea*. **Primera diferenciación:** Especie poliploide con genomio A se habría diferenciado en los genomios A y B. **Segunda diferenciación:** Fundamentalmente los genomios B habrían mutado o diferenciado entre si para dar lugar a las diferentes especies de *Zea* con $2n=20$. En el caso de *Zea perennis* los cromosomas del genomio B a su vez habrían sufrido otra diferenciación dando lugar a los cromosomas homeólogos Bp₁ y Bp₂.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

Con el objetivo de dilucidar las relaciones filogenéticas, el nivel de ploidía y la diferenciación en la evolución de los genomioms homeólogos del género *Zea*, se analizó el fenotipo, genotipo, fertilidad, morfología cromosómica, configuración meiótica y el apareamiento cromosómico e intergenómico críptico de los genomioms homeólogos en especies e híbridos de *Zea*. De los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. No se han observado diferencias significativas en la longitud relativa de los cromosomas de las especies del complejo *Zea*, apreciándose sólo pequeñas variaciones de tamaño en algunas especies.
2. En los híbridos entre especies de *Zea*, los cromosomas homeólogos se aparearon entre sí, no mostrando diferencias de tamaño entre ellos. Las excepciones fueron el dihíbrido *Zea mays* x *Zea parviglumis* y el trihíbrido entre *Zea mays* x *Zea diploperennis* x *Zea luxurians*, donde se aparearon tres pares de cromosomas homeólogos de distinto tamaño.
3. La diferencia morfológica más notable entre los cromosomas del maíz y los de las especies silvestres fue la posición de los *knobs*. Mientras que el maíz carecía de *knobs*, o eran intersticiales, los *knobs* de las especies silvestres eran terminales, pudiendo ser pequeños, medianos o grandes. En los híbridos, los *knobs* de las especies silvestres incrementaron significativamente su tamaño.
4. Del análisis de las configuraciones meióticas de especies e híbridos de *Zea*, agrupados de acuerdo a su nivel de ploidía, se infirió lo siguiente:
 - A excepción de *Z. mays* con $2n=40$ y los híbridos *Z. mays* x *Z. mays* con $2n=30$ y *Z. parviglumis* x *Z. diploperennis* con $2n=40$, las especies e híbridos con un mismo nivel de ploidía tenían

similares configuraciones meióticas, número de quiasmas, fertilidad del polen y viabilidad de las semillas.

- En especies e híbridos de *Zea* con $2n=20$, la configuración meiótica más frecuente fue de 10II. En todos los híbridos, se aparearon los cromosomas de los genomios A y B de las distintas especies
- En los híbridos con $2n=30$, la configuración meiótica más frecuente fue de 5III+5II+5I. Los trivalentes estaban formados por el apareamiento de los cromosomas del genomio A de las distintas especies, los bivalentes por el apareamiento de los cromosomas del genomio B de la especie con mayor nivel de ploidía y los univalentes por los cromosomas del genomio B de la especie con menor nivel de ploidía. La excepción fue el híbrido ($2n=30$) entre los maíces con distinto nivel de ploidía ($2n=20$ y $2n=40$), en el que, debido a la homología cromosómica, se aparearon los cromosomas de los genomios A y B entre sí, produciéndose como consecuencia un elevado número de trivalentes.
- En el grupo de especies e híbridos con $2n=40$ se presentaron distintas situaciones. La configuración meiótica más frecuente de *Zea perennis* y los híbridos con $2n=40$ fue de 5IV+10II. Los tetravalentes serían el producto del apareamiento de los 5 cromosomas del genomio A de ambas especies y los bivalentes el resultado del apareamiento de los 5 cromosomas del genomio B de cada una de las especies que integran el híbrido. Las excepciones fueron *Zea mays* con $2n=40$, que tuvo un alto porcentaje de tetravalentes y un bajo porcentaje de bivalentes y, en el otro extremo, el híbrido excepcional producto de la duplicación cromosómica reciente de *Z. parviglumis* x *Z. diploperennis*. En este nuevo híbrido se habrían apareado

preferentemente los cromosomas homólogos de los genomios A y B de cada una de las especies, produciéndose como consecuencia un elevado porcentaje de bivalentes y un bajo porcentaje de tetravalentes.

5. La fertilidad en los híbridos estaba íntimamente relacionada con el nivel de ploidía. Los híbridos con $2n=20$ o $2n=40$ eran fértiles, mientras que los híbridos con $2n=30$ eran estériles. De estos resultados se dedujo que la fertilidad en los híbridos de *Zea* está asociada a un balance cromosómico del híbrido y no a una diferencia cromosómica.
6. En los híbridos se manifestaron características fenotípicas que no tenían ninguno de sus progenitores, como por ejemplo clorantia.
7. El apareamiento críptico de los cromosomas homeólogos del Género *Zea*, inducido con solución diluida de colchicina, fue diferente según el nivel de ploidía:
 - En especies e híbridos con $2n=20$ se aparearon los cromosomas homeólogos de ambos genomios, obteniéndose hasta un máximo de 5IV. Las excepciones fueron *Zea diploperennis* y los híbridos con esta especie, en los que no se indujo el apareamiento críptico de los cromosomas homeólogos.
 - En los híbridos con $2n=30$ se incrementó el apareamiento críptico de los cromosomas homeólogos hasta un máximo de 10III, siendo la excepción el híbrido entre *Z. mays* x *Z. mays* con $2n=30$ donde no se observaron diferencias significativas entre el material tratado y el control.
 - En especies e híbridos con $2n=40$ se produjo un apareamiento críptico de los cromosomas homeólogos hasta un máximo de 10IV, a excepción de *Z. mays* con $2n=40$ donde prácticamente no hubo diferencias significativas entre el material tratado y el control.

8. Los resultados obtenidos confirman la hipótesis de que el Género *Zea* es un poliploide con dos genomios (A y B) de 5 cromosomas cada uno. Los cromosomas homeólogos del genomio A no se habrían diferenciado, razón por la cual los cromosomas homeólogos del genomio A se aparearon en los híbridos como si fuesen homólogos. En cambio, los cromosomas homeólogos del genomio B habrían sufrido modificaciones (cambios estructurales o puntuales), razón por la cual en los híbridos sólo se aparearon los cromosomas homeólogos del genomio B de las distintas especies cuando no estaban presentes los cromosomas homólogos correspondientes. La diferenciación del genomio B podría haber dado origen a las distintas especies de *Zea*.
9. Mediante tratamiento con soluciones diluidas de colchicina se indujo el apareamiento intergenómico críptico de los genomios A y B de casi todas las especies e híbridos del género *Zea*, con la excepción de *Zea diploperennis* y sus híbridos. La falta de apareamiento intergenómico críptico de los genomios A y B de *Zea diploperennis* tratados con soluciones diluidas de colchicina podría deberse a que tengan distinto origen, o bien a que han tenido una diferenciación mayor que en el resto de las especies, lo que impide que los genomios homeólogos manifiesten el apareamiento intergenómico críptico.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA,

ALLEN, J.O. 2005. Effect of teosinte cytoplasmic genomes on maize phenotype. *Genetic* **169**:863-880.

ANANIEV, E.V.; PHILLIPS, R.L.; RINES, H.W. 1998a. A knob-associated tandem repeat in maize capable of forming fold-back segments: Are chromosome knobs megatransposons? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:10785-10790.

ANANIEV, E.V.; PHILLIPS, R.L.; RINES, H.W. 1998b. Complex structure of knob DNA on maize chromosome 9: retrotransposon invasion into heterochromatin. *Genetics* **149**:2025-2037.

BASS, H.W. 2003. Telomere dynamics unique to meiotic prophase: formation and significance of the bouquet. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**:2319-2324.

BASS, H.W.; RIERA-LIZARAZU, O. ANANIEV, E.V. B BORDOLINI, S.J.; RINES, H.W.; PHILLIPS, R.L.; SEDAT, J.W.; AGARD, D.A.; CANDE, Z.W. 2000. Evidence for the coincident initiation of homologous pairing and synapsis during the telomere-clustering (bouquet) stage of meiotic prophase. *Journal of Cell Sciences* **113**:1033-1042.

BEADLE, G.W. 1932a. Studies of *Euchlaena* and its hybrids with maize. 1 Chromosome behavior in *Euchlaena* hybrids *Zeitschr Abstammungs Vererbungs* 291-303

BEADLE, G.W. 1932b. The relation of crossing over to chromosome. Association in *Zea-Euchlaena* hybrids. *Genetics* **17**:491-501.

BEADLE, G.W. 1939. Teosinte and the origin of maize. *Journal of Heredity* **30**:245-247.

BEADLE, G.W. 1977. The mystery of maize. 32nd Annual Corn and Sorghum Research Conference 1-5.

- BEADLE, G.W.** 1978. Teosinte and the origin of maize in Maize Breeding and Genetics. Ed. DB Walden. John Wiley and Sons New York.
- BEADLE, G.W.** 1980. The origin of maize. *Pour la Science* **29**:59-71.
- ANDRÉS, J.M.** 1950. Granos semivestidos restos de un carácter ancestral del maíz. *Rev. Arg. de Agron.* **17(4)**:252-256
- BEADLE, G.W.** 1981. Origin of corn: Pollen evidence. *Science* **213**:890-892.
- BENNETT, M.D.** 1983. The spatial distribution of chromosomes. In: Brandham P.E., Bennett, M.D. (eds). *Kew Chromosome Conf II*.
- BENNETT, M.D.** 1984. The genome, the natural karyotype and biosystematics. In: Grant WF (ed). *Plant biosystematics*. Academic Press, New York, p 41-66.
- BENNETZEN, J.L.** 1996. Nested retrotransposons in the intergenetic regions of the maize genome. *Science* **274**:756-768.
- BENAVENTE, E.; ALIX, K.; DUSAUTOIR, J. ; ORELLANA, J.; DAVID, J.** 2001. Early evolution of chromosomal structure of *Triticum turgidum-Aegilops ovata* amphiploids carrying and lacking the *Ph1* gene. *Theor. App. Genet.* **103**:1123-1128.
- BOLKHOVSKIKH, Z.; GRIF, V.; MATVEJEVA, O.; ZAKHARYEVA, O.** 1969. Chromosome number of flowering plants. Leningrad Acad. Sci. USSR. Reimpresión Koelz O Sci Publ, Koenigstein, FRG 1974.
- BOMBLIES, K.; WANG, R.L.; AMBROSE, B.A.; SHMIDT, R.J.; MEELEY, R.B.; DOBLEY, J.F.** 2003. Duplicate *Floricula* / leaf homologs *zfl₁* and *zfl₂* control inflorescence architecture and flower patterning in maize. *Development* **126**:2385-2395.
- BOZZA, C.G.; PAWLOWSKY, W.P.** 2008. The cytogenetics of homologous chromosome pairing in meiosis in plants. *Cytogenet. Genome Res.* **120**:313-319.

- BRADLEY, M.V.; GOODSPEED, T.H.** 1943. Colchicine-induced allo- and autotetraploidy in *Nicotiana*. Proceedings National Academy of Sciences **29**:295-301.
- BRIGGS, W.; MCMULLEN, M.; GAUT, B.; DOEBLEY, J.** 2007. Linkage mapping of domestication loci in a large maize-teosinte backcross resource. Genetic **177**:1915-1928.
- BROWN, S.W.** 1950. Supurious secondary association and asymmetric spindles in *Luzula*. Cytologia **15**:259-268.
- BRUNNER, S.; FENGLER, K.; MORGANTE, M.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A.** 2005. Evolution of DNA sequence nonhomologies among maize inbreds. Plant Cell **17**:343-360.
- BUCKLER E.S.; PHELPS-DURR, T.L.; BUCKLER C.S.; DAWE, R.K.; DOEBLEY, J.F.; HOLTSFORD, T.P.** 1999. Meiotic drive of chromosomal knobs reshaped the maize genome. Genetics **153**:415-426.
- BUGGS, R.J.; DOUST, A.N.; TATE, J.A.; KOH, J.; SOLTIS, K.; FELTUS, F.A.; PATERSON, A.H.; SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E.** 2009 Gene silencing in *Tragopogon miscellus* (Asteraceae): comparison of natural and synthetic allotetraploids. Heredity **103**:73-81.
- CALDERON-URREA, A; DELLAPORTA, S.L.** 1999. Cell Death and cell protection genes determine the fate of pistils in maize. Development **126**:435-441.
- CELARIER, R.P.** 1956. Additional evidence for five as the basic chromosome number of the Andropogoneae. Rhodora **58**:135-143.
- CATCHESIDE, D.G.** 1937. Secondary pairing in *Brassica oleracea*. Cytologia 366-378.
- CELARIER, R.P.** 1957a. *Elyonorus argenteus*, a South African Grass with five chromosome pairs. Bull Torrey Bo. Club **84**:157-162.

- CELARIER, R.P.** 1957b. Cytotaxonomy of the Andropogoneae. 2- Subtribes Ischaeminae, Rottboellinae and the Maydeae. *Cytologia* **22**:160-183.
- CERMEÑO, M.C.; ORELLANA, J.; SANTOS, L.; LACADENA, J.R.** 1984. Nucleolar activity and competition (amphiplasty) in the genus *Aegilops*. *Heredity* **53(3)**:603-611.
- CHAGANTI, R.S.K.** 1965. Cytogenetic studies of Maize-Tripsacum hybrids and their derivatives. The Bussey Institution. Harvard University, 93 p.
- CHEN, Z.J.** 2007. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual Review of Plant Biology* **58**:377-406.
- CHEN, C.C.; CHEN, C.M.; HSU, F.C.; WANG, C.J.; YANG, J.T.; KAO, Y.Y.;** 2000. The pachytene chromosomes of maize as revealed by fluorescence in situ hybridization with repetitive DNA sequences. *TAG* **101**:30-36
- CHEN, M.; HA, M.; LACHEY, E.; WANG, C.J.; CHEN, C.C.;** 2008. RNA of *met 1* reduce DNA methylation and induces genome-specific changes in gene expression and centromeric small RNA accumulation in Arabidopsis allopolyploids. *Genetics* **178**:1845-1858.
- CLARK, R.M.; LINTON, E.; MESSING, J.; DOEBLEY, J.F.;** 2004. Pattern of diversity in the genomic region near the maize domestication gene *tb1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:700-707.
- CLARK, R.; TAVARÉ, S.; DOEBLEY, J.** 2005. Estimating a nucleotide substitution rate for maize from polymorphism at a major domestication locus. *Mol. Biol. Evol.* **22(11)**: 2304-2312.
- CLARK, R.M.; WABER, T.N.; QUIJADA, P.; DOEBLEY, J.F.;** 2006. A distant upstream enhancer at the maize domestication gene *tb1* has pleiotropic effects on plant and inflorescent architecture. *Nature Genetics* **38**:594-597.

- COLLINS, G.N.; KEMPTON, J.H.** 1920. A teosinte-maize hybrid. J. Agric. Research **19**:1-38.
- COMAI, L.** 2005. Advantages and disadvantages of polyploidy. Nat. Rev. Genet. **6**:836-846.
- CONE, K.; COCCIOLONE, S.; BURR, F.; BURR, B.** 1993. Maize anthocyanin regulatory gene *pl*. Is a duplicate of *c1* that functions in the plant. The Plant Cell **5**:1795-1805.
- COWAN, C.R.; CANDE, W.Z.** 2002. Meiotic telomere clustering is inhibited by colchicine but does not require cytoplasmic microtubules. Journal of Cell Science **115**: 3747-3756.
- DARLINGTON, C.D.** 1928. Studies in *Prunus*. J. Genet. **19**:213-256.
- DARLINGTON, C.D.; MOFFETT, A.A.** 1930. Primary and secondary chromosome balance in *Tyrus*. Jour. Genet. **22**:129-151.
- DARLINGTON, C.D.** 1956 Chromosome Botany. Allen y Unwin, London.
- DARLINGTON, C.D.; WILEY, A.P.** 1956. Chromosome Atlas of flowering plants. Allen and Unwin, London.
- DENNIS, E.S.; PEACOCK, W.J.** 2005. Knob heterochromatin homology in maize and its relatives. Journal of Molecular Evolution **20**:341-350.
- DOBZHANSKY, T.; AYALA, F.; STEBBINS, G.L.; VALENTINE, J.** 1980. Evolución. Ediciones Omega S.A. Barcelona.
- DOEBLEY, J.** 1990. Molecular systematics of *Zea* (Gramineae). Maydica **35**:143-150.
- DOEBLEY, J.** 2004. The genetics of maize evolution. Annu. Rev. Genetic **38**:37-59.
- DOEBLEY, J.; BACIGALUPO, A.; STEC, A.** 1994. Inheritance of kernel weight in two maize-teosinte hybrid populations implications for crop evolutions. J. Heredity **85(3)**:191-195.

- DOBLEY, J.; GAUT, B.; SMITH, B.** 2006. The molecular genetics of crop domestication. *Cell* **127**:1309-1321.
- DOEBLEY, J.; ILTIS, H.H.** 1980. Taxonomy of *Zea* (Gramineae). I. A subgeneric classification with key to taxa. *Amer. J. Bot.* **67**:982-993.
- DOEBLEY, J.; STEC, A.** 1991. Genetic analysis of the morphological differences between maize and teosinte. *Genetics* **134**:283-295
- DOEBLEY, J.; STEC, A.** 1993. Inheritance of the morphological differences between maize and teosinte: comparison of results for two F₂ populations. *Genetics* **134**:559-570.
- DOEBLEY, J.; STEC, A.; GUSTUS, C.** 1995. Teosinte branched1 and the origin of maize evidence for epistasis and the evolution of dominance. *Genetics* **141**:333-346.
- DOEBLEY, J.; STEC, A.; HUBBARD, L.** 1997. The evolution of apical dominance in maize. *Nature* **386**:484-488.
- DOVER, G.A.; RILEY, R.** 1973. The effect of spindle inhibitors applied before meiosis on meiotic chromosome pairing. *J. Cell Sci.* **12**:143-161.
- DORWEILER, J.; DOBLEY, J.F.** 1997. Developmental analysis of teosinte glume architecture1: a key locus in the evolution of Maize (Poaceae). *Am. J. Bot.* **87**:1313-1322.
- DORWEILER, J.; STEC, A.; KERMICLE, J.; DOBLEY, J.F.** 1993. teosinte glume architecture1 a genetic locus controlling a key step in maize evolution. *Science* **262**:233-235.
- DRISCOLL, C.J.; DARVEY, N.L.,** 1970. Chromosome pairing: effect of colchicine on an isochromosome. *Science* **169**:290-291.
- DRISCOLL, C.J.; DARVEY, N.L.; BARBER, H.N.** 1967. Effect of colchicine on meiosis of hexaploid wheat. *Nature* **216**: 687-688.
- ELLENESKOG-STAAM, P.; LOAISIGA, C.H.; MERKER, A.:** 2007. Chromosome C-banding of the teosinte *Zea nicaraguensis* and to other *Zea* species. *Hereditas* **144**:96-101.

- EMERSON, R.A.; BEADLE, G.W.** 1932. Studies of *Euchlaena* and its hybrids with *Zea*. II Crossing over between the chromosomes of *Euchlaena* and those of *Zea*. *Zeitschr Abstom Verebungs* 306-315.
- EMRICH, S.; LI, L.; WEN, T.; YANDEAU-NELSON, M.; FU, Y.; GUO, L.; CHOU, H.; ALURU, H.; ASHLOCK, D.; SCHNABLE, P.** 2007. Nearly identical paralogs: Implications for maize (*Zea mays* L) genome evolution. *Genetics* **175**:429-439.
- EUBANK, M.** 1997. Molecular analysis of crosses between *Tripsacum dactyloides* and *Zea diploperennis* (Poaceae). *Theor. Appl. Genet.* **94** :707-712.
- EUBANK, M.** 2001. The mysterious origin of maize. *Econ. Bot.* **55**:492-512.
- FELDMAN, M.** 1993. Cytogenetic activity and mode of action of the pairing homoeologous (*Ph1*) gene of wheat. *Crop Sci.* **33**:894-897.
- FELDMAN, M.; AVIVI, L.** 1988. Genetic control of bivalent pairing in common wheat. The mode of *Ph1* action. In Brandham PE (ed) Kew conference III, 269-279.
- FELDMAN, F.; LIU, B.; SEGAL, G.; ABBO, S.; LEVY, A.** 1997. Rapid elimination of low copy DNA sequences in polyploidy wheat: a possible mechanism for differentiation of homeologous chromosomes. *Genetics* **147**:1381-1387.
- FLAVEL, R.B.** 1986. Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Philos Trans. R Soc. Lond Ser- B* **312**:327-342
- FORD, L.** 1970. Chromosome association in *Zea mays* monoloids. *The Nucleus* **XIII**, **2**:99-105.
- FU, Y.; HSIA, A.; GUI, L.; SCHNABLE, P.** 2004. Types and frequencies errors in methyl filtered and high Cot maize genome survey sequences. *Plant Physiol.* **135**:2040-2045.
- FUKUNAGA, K.; HILL, J.; VIGOUROUX, Y.; MATSUOKA, Y.; SANCHEZ, J.; LIU, K.; BUCKLER, E.; DOEBLEY, J.** 2005. Genetic

diversity and population structure of Teosinte. *Genetics* **169**: 2241-2254.

GALINAT, W.C. 1971. The origin of maize. *Annual Review of Genetics* **5**:447-478.

GALINAT, W.C. 1974. Intergenomic mapping of maize, teosinte and *Tripsacum*. *Evolution* **27-4**:644-655.

GALINAT, W.C. 1977. The origin of corn. In *Corn and Corn Improvement*, ed. GF Sprague p 1-47. Madison: Amer. Soc. Agron.

GALINAT, W.C. 1983. The origin of maize as shown by key morphological traits of its ancestor teosinte. *Maydica* **28**:121-138.

GALINAT, W.C. 1978. The inheritance of some traits essential to maize and teosinte. In *Maize Breeding and Genetic*, ed. DB.

GARCIA, M.D., MOLINA, M. DEL C., CASO, O.H. 1992. La regeneración de plantas de maíz (*Zea mays* ssp. *mays*) a partir del cultivo de tejidos y sus aplicaciones en el mejoramiento de maíz. *Rev. de la Fac. de Agronomía de la UNLP* **68**:15-25.

GAY J.P. 1984. *Fabuleux maïs. Historia et avenir d'une plante.* Association Générale des Producteurs de Maïs. A.G.P.M. Pau.

GAY, J.P.; MENETIER, A 1978. *Morphogenèses des organes reproducteurs chez le maïs: mise au point d'une échelle de notation des stades.* Editorial A.G.P.M.

GHATNEKAR, M.V. 1965. Spontaneous chromosome aberrations and abnormal behaviour in Italian maize populations. *Cytologia* **30**:426-435.

GILLIES, C. 1989. Chromosome pairing and fertility in polyploids, 137-176 in *Fertility and Chromosome Pairing: Recent studies in plants and animals*. CRC Press, Boca Raton, FL.

GOLUBOSKAYA, I.N.; HARPER, L.C.; PAWLOWSKI, W.P.; SCHICNES, D.; CANDE, W.Z. 2002. The *pam1* gene is required for meiotic bouquet formation and efficient homologous synapsis in maize (*Zea mays* L.). *Genetics* **162**:1979-1993.

- GOTTLIEB, L.D.** 1982. Conservation and duplication of isozymes in plant. *Science* **216(3544)**:373-380
- GRIFFITHS, R.; SHARP, R.; FOOTE, T.; BERTIN, I.; WANOUS, M.** 2006. Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature* **439**:749-752.
- HAN, Y. H.; LI, L. J.; SONG, Y. C Z; LI, Y.; XIONG, Z. Y.; LI, D. Y.** 2003. Physical mapping of the 5S and 45S rDNA in teosintes. *Hereditas* **137-1**: 16-19
- HARPER, L.; GOLUBOVSKAYA, I.; CANDE W.Z.** 2004. A bouquet of chromosomes. *Journal of Cell Sciences* **117**:4025-4032.
- HIRAYOSHI, I.** 1957. The chromosomal relationship in *Oryzaeae Zinzanieae*. *Proc. Inter.Genet. Symposia, Tokyo*. 293-297.
- HSU, F.C. ; WANG, C.J. ; CHEN, M.C. ; HU, H.Y. ; 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.
- HUBBARD, L.; Mc STEEN, P.; DOEBLEY, J.; HAKE, S.** 2002. Expression patterns and mutant phenotype of *teosinte branched 1* correlate with growth suppression in maize and teosinte. *Genetics* **162**:1927-1953.
- JAUHAR, P.; ALMOUSLEM, A.; PETERSON, T.** 1999. Inter and intragenomic chromosome pairing in haploids of durum wheat. *Am. Genet. Ass.* **90**:437-445.
- JENKINS, G.; CHATTERJEE, R.** 1994. Chromosome structure and pairing preferences in autotetraploid rye (*Secale cereale*). *Genome* **37**:784-793
- KATO, Y.C.** 1976. Chromosome polymorphism of Teosinte. *Genetic* **83**:737-742.
- KURITA, M.** 1946. Secondary association of chromosome in the castor oil plant. *Jap. Journ. Genet.* **21**:63

- ILTIS, H.H.** 1981. The catastrophic sexual transmutation. Theory (C.S.T.T). From the teosinte tassel spike to the ear of corn. XII International Botanical Congress. Sydney Australia. Abstract 21-28.
- ILTIS, H.H.; DOEBLEY J.** 1980a. Taxonomy of *Zea* (Gramineae). I A subgeneric classification with key to taxa. Amer. Journ. Bot. **67**:982-993.
- ILTIS, H.H.; DOEBLEY J.** 1980b. Taxonomy of *Zea* (Gramineae). II Subspecific categories in the *Zea mays* complex and a generic synopsis. Amer. Journ. Bot. **67**:994-1004.
- ILTIS, H.H., DOBLEY, J.F., GUZMÁN, M.R., PAZY, B.** 1979. *Zea diploperennis* (Gramineae). A new teosinte from Mexico. Science **203**:180-187.
- JACKSON, R.C.; MURRAY, B.G.** 1983. Colchicine-induced quadrivalent formation in *Heliantus*: evidence of ancient polyploid. Theor. Appl. Genet. **64**:219-222.
- JACOB, K.M.** 1957. Secondary association in the castor oil plant. Cytologia **22**:380-392.
- JATIMLIANSKY, J.R.; GARCÍA M.D., MOLINA M. C.** 2004. Response to chilling of *Zea mays*, *Tripsacum dactyloides* and their hybrid. Biología Plantarum **48**: 561-567.
- JENCZEWSKI, E.; ALIX, K.** 2004. From diploids to allopolyploids: the emergence of efficient pairing control genes in plants. Crit. Rev. Plant Sci. **23**:21-25.
- JHON, B.; LEWIS, K.R.** 1965. The meiotic system. Protoplasmatologia VI Fl. Springer, Wien, pp 1-335.
- JIANG, N.; BAO, Z.; ZHANG, X.; EDDY,S.; WESSLER, S.** 2004. Pack-MULE transposable elements mediate gene evolution in plants. Nature **431**:569-573.

- JURETIC, N.; HOEN, D.; HUYNH, M.; HARRISON, P.; BUREAU, T.** 2005. The evolutionary fate of MULE-mediated duplications of host gene fragments in rice. *Genome Res-* **15**:1292-1297.
- KATO, T.A.** 1976. Cytological studies of maize and teosinte in relation to their origin and evolution. *Mass. Exp. Stn. Coll. and Food Mat. Resources Bull.* **636**. 190 p.
- KATO, T.A.** 1982. Knobs constitution of perennial teosinte. *Maize Genetic Cooperation Newsletter* **56**:35
- KATO, T.A.** 2009. Double kernel fruitcases found in teosinte populations. *Maize Genetic Cooperation Newsletter* **83**:27-28
- KEMPTON, J.H.** 1926. Maize and man. *Journal of Heredity* **17**:33-51.
- KIMBER, G.; RILEY, R.** 1963. Haploid angiosperms. *Bot. Rev.* **29**:480-531.
- LACADENA, J.R.; CERMENO, M.C.; ORELLANA, J.; SANTOS, J.L.** 1998. Nucleolar competition in Triticeae. *Proceeding Kew Chromosome Conference III, held Royal Botanical Gardens, Kew, Inglaterra. Editores Brandham Her Majesty's Stationery Office, Londres* pag. 151-165.
- LAI, J. ; LI, Y.; MESSING, J.; DOONER, H.** 2005. Gene movement by *Helitron* transposons contributes to the haplotype variability of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:9068-9073.
- LAL, S.; GIROUX, M.; BRENDDEL, V.; VALLEJOS, C.; HANNAH, L.** 2003. The maize genome contains a *Helitrons* insertion. *Plant Cell* **15**:381-391.
- LAL, S.; HANNAH, L.** 2005. *Helitrons* contribute to the lack of gene colinearity observed in modern maize inbreds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:9993-9994.
- LANGHAN, D.G.** 1940. The inheritance of intergeneric differences in *Zea-Euchlaena* hybrids. *Genetic* **25**:88-108.

- LAURIE, D.A.; BENNETT, H.** 1985. Nuclear DNA content in the genera *Zea* and *Sorghum*. Intergeneric, interspecific and intraespecific variation. *Heredity* **55**:307-313.
- LAURIE, C.C.; CHASALOW, S.D.; LEDEAUS, J.; McCARROLL, R.; BUSH, D.** 2004. The genetic architecture of response to long-term artificial selection for oil concentration in maize kernel. *Genetic* **168**:2141-2155.
- LAWRENCE, W.J.C.** 1931. The secondary association of chromosomes. *Cytologia* **2**:352-384.
- LEVAN, A.** 1942. Studies on the meiotic mechanism of haploid Rye. *Hereditas* **28**:177-211.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A.** 1964. Nomenclature for centromeric position of chromosomes. *Hereditas* **52**:201-220.
- LIMA BRITO, J; GUEDES PINTO, H.; HESLOP HARRISON, J.S.** 1998. The activity of nucleolar organizing chromosomes in multigeneric F1 hybrids involving Wheat, Triticale and Tritordeum. *Genome* **41**:763-768
- LISCH, D.; CHOMET, P.; FREELING, M.** 1995. Genetic characterization of the *Mutator* system in maize: behavior and regulation of *Mu* transposons in a minimal line. *Genetics* **139**:1777-1796.
- LIU, B.; ADAMCZYK, K.; MANZANARES-DAULEX, M.; EBER, F.; LUCAS, M.; DELOURME, R.; CHEVRE, A.; JENCZEWSKY, E.** 2006. Mapping *PrBn* and other quantitative trait loci responsible for the control of homeologous chromosome pairing in oilseed rape (*Brassica napus* L.) haploids. *Genetics*, **174**:1583-1596.
- LIU, B.; BRUBAKER, C.; MERGEAI, G.** 2001. Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes. *Genome* **44**:321-330.

- LIU, B.; VEGA, J.; SEGAL, G.** 1998a. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. I Changes in low-copy non coding DNA sequences. *Genome* **41**:272-277.
- LIU, B.; VEGA, J.; FELDMAN, M.** 1998b. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploid of *Triticum* and *Aegilops*. II Changes in low copy coding DNA sequences. *Genome* **41**:535-542.
- LIU, B.; VEGA, J.; LOIDL, J.** 1990. The initiation of meiotic chromosome pairing: the cytological view. *Genome* **33**:759-778.
- LONGLEY, A.E.** 1924. Chromosome en maize and maize relatives. *Jour. Agric. Research* **28-7**:673-682.
- LONGLEY, A.E.** 1934. Chromosome in hybrids between *Euchlaena perennis* and *Zea mays*. *Jour. Agric. Research* **58**:789-806.
- LUKENS, L :N ; DOEBLEY, J.F.** 1999. Epistatic and environmental interactions for quantitative trait loci involved in maize evolution. *Genet. Res.* **74**:291-302.
- MANGELSDORF, P.C.** 1983. Corn its origin, evolution and improvement. The Berkley Press of Harvard University, 262 p.
- MANGELSDORF, P.C., REEVES, R.G.** 1940. L`origine du mais. *Rev. Bot. Appl.* 628-633.
- MATTHEWS, D.L.; GROGAN, C.O.; MANCHESTER, C.** 1974. Terminal ear mutants of maize (*Zea mays*). *J. Agric. Science (Camb)* **82**:433-435.
- MAZOTI, L.B.** 1949. Nuevos aportes a la genética del maíz. *Ciencia e Investigación* **5**:387-388
- MAZOTI, L.B.** 1950. Nuevos hallazgos acerca de las unidades de la herencia. *Genes y Plasmodios. Revista Argentina de Agricultura.* **17**:145-162.
- MAZOTI, L.B.** 1954a. Caracteres citoplasmáticos heredables derivados del híbrido de *Euchlaena* por *Zea*. *Revista de Investigación Agrícola,* **8(2)**: 175-183.

- MAZOTI, L.B.** 1954b. Variación citoplasmática heredable y su reversión por acción de genes simples en el maíz. *Revista de Investigación Agrícola* **8(2)**: 185-186.
- MAZOTI, L.B.** 1963. Inducción de variaciones heredables en el núcleo de *Zea* por acción de un citoplasma de *Euchlaena*. *Rev. Fac. Agron. La Plata* **39**: 204-205.
- MAZOTI, L.B.; P. RIMIERI.** 1978. Obtención de híbridos entre *Euchlaena perennis* Hitch y su posible utilización fitotécnica. *Rev. Fac. Agron. La Plata* **54**: 579-586.
- MAZOTI, L.B.** 1978. Interacción entre el gene *C2 – IE 7002 DF Zea mays* y un citoplasma (plasmón) diferenciado de *Euchlaena mexicana*. *Rev. Fac. Agr. La Plata*. **54**: 477-496.
- MAZOTI L.B.; VELASQUEZ, R.S.** 1963. Volumen de los *knobs* según citoplasma. *Rev. Fac. Agron. La Plata* **39**: 203-204.
- McCLINTOCK, B. 1930.** A cytological demonstration of the location an interchange between two non-homologous chromosomes of *Zea mays*. *Genetics* **16**:791-796.
- McCLINTOCK, B.** 1933. The association of non-homologous parts of chromosomes in midprophase of meiosis in *Zea mays*. *Z. Zellforsch Mikrosk Anat.* **19**:191-237.
- MESSING, J.; BHARTI, A.; KARLOWSKY, H.; GUNDLACH, H.; KIM, H.** 2004. Sequence composition and genome organization of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:14349-14354.
- MOAZED, D.** 2009. Small RNAs in transcriptional gene silencing and defence. *Nature* **457(7228)**:413-420.
- MOLINA M. DEL C.** 1978. Estudios citogenéticos del híbrido intergenérico *Euchlaena perennis* Hitch por *Zea mays*. *Rev. Fac. Agron. La Plata* **54**: 521-578.
- MOLINA M. DEL C. 1981.** Estudios citogenéticos del híbrido entre las especies *Zea diploperennis* y *Zea perennis*. *Archivos de Biología y*

Medicina Experimental. Órgano de la Sociedad de Biología de Chile **14** (1): 70.

MOLINA M. DEL C. 1982. Cytogenetic studies on interspecific hybrids between *Zea diploperennis* and *Z. perennis*. Maize Genet. Coop. Newsletter **56**: 96-97.

MOLINA M. DEL C. 1983. Cytogenetic studies on *Zea diploperennis*. The Nucleus **26**(1):1-7.

MOLINA M. DEL C. 1985. Cytogenetic study of a tetraploid hybrid *Zea diploperennis* x *Zea perennis*. Cytologia **50**: 643-648.

MOLINA M. DEL C. 1986. Estudio citogenético de *Zea perennis*. Genética Ibérica **38**:27-45.

MOLINA M. DEL C.; CHORZEMPA, S.E.; GARCÍA, M.D. 2005. Meiotic pairing in the hybrid (*Zea mays* x *Zea diploperennis*) x *Zea luxurians*. Maize Genetics Cooperation Newsletter **79**:5-7

MOLINA M. DEL C.; GARCÍA, M.D. 1999. Influence of ploidy levels on phenotypic and cytogenetic traits in maize and *Zea perennis* hybrids. Cytologia **64**:101-109.

MOLINA M. DEL C.; GARCÍA, M.D. 2000. Meiotic pairing in the interspecific hybrid *Zea mays*, *Z. perennis* and *Zea diploperennis*. Maize Genet. Coop. Newsletter **74**: 42-43.

MOLINA M. DEL C.; GARCÍA, M.D. 2001. Ploidy levels affect phenotype and cytogenetic traits in *Zea mays* ssp. *mays* (2n=20 or 40) and *Zea mays* ssp. *parviglumis* hybrids. Cytologia **66**(2): 189-196.

MOLINA M. DEL C.; GARCÍA, M.D.; CHORZEMPA, S.E. 2006. Meiotic study of *Zea mays* ssp. *Mays* x *Tripsacum dactyloides* (2n=72) hybrid and its progeny. Electronical Journal of Biotechnology **9**(3):1-5.
<http://efbiotechnology.ucv.cl/content/vol9/issue3>

MOLINA M. DEL C.; NARANJO C.A. 1987. Cytogenetic studies in the genus *Zea*. I. Evidence for five as the basic chromosomes number. Theor. Appl. Genet. **73**: 542-550.

- MOLINA M. DEL C.; ROSALES T.P.** 1983. Obtención de un híbrido interespecífico entre las especies *Zea mays* y *Zea diploperennis*. *Agrarius* **1**: 89-93.
- MOLINA M. DEL C.; GARCIA M.D.; LÓPEZ C.G.; MORENO FERRERO, V.** 2004. Meiotic pairing in the hybrid (*Zea diploperennis* x *Zea perennis*) x *Zea mays* and its reciprocal. *Hereditas* **141**: 1-7
- MONTGOMERY, E.G.** 1906. What is an ear of corn. *Popular Science Monthly* **68**:55-62
- MORGANTE, M.; BRUNNER, S.; PEA, G.; FENGLER, K. ; ZUCCOLO, A.** 2005. Gene duplication and exon shuffling by *helitron-like* transposons generate intraespecific diversity in maize. *Nat. Genet.* **37**:997-1002
- MURRAY, B.G.; JACKSON, R.C.; BARKER, N.R.** 1983. Cryptic genome homologs revealed by pre-meiotic colchicine treatment of meiocytes. In: Brandham P.E., Bennett, M.D. (eds) *Kew chromosome conference II*, 165-171.
- NARANJO, C.A.; MOLINA, M.C.; POGGIO, L.** 1989. Evidencias de un número básico $x = 5$ en el género *Zea* y su importancia en estudios del origen del maíz. *Acad. Nac. Cs. Ex. Fis. Y Nat. Monografía* **5**:75-84.
- NEUFFER, M.G.; COE, E.H.; WESSLER, S.R.** 1997. *Mutants of maize*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- OLIVEIRA, C.I.; PICUDO, H.E.M.C.; ITOYAMA, M.M.** 2006. New evidence for nucleolar dominance in hybrids of *Drosophila arizonae* and *Drosophila mulleri*. *Genet. Mol. Res.* **5 (4)**: 632-637
- PARODI, L.R.** 1959. *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. Vol. 1, Descripción de las Plantas Cultivadas. Editorial ACME, Buenos Aires. 931 p.
- PASAPULETI, C.V.; GALINAT, W.C.** 1982. *Zea diploperennis*. 1 Its chromosomes and comparative cytology. *The Journal of Heredity* **73**:168-170.

- PEACOCK, W.J.; DENNIS, E.S.; RHOADES, M.M.; PRYOR, A.J.** 1981. Highly repeated DNA sequence limited to knob heterochromatin in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:4490-4494.
- POGGIO, L.; MOLINA, M.C.; NARANJO, C.A.** 1990. Cytogenetic studies in the genus *Zea*. 2- colchicine-induced multivalents. *Theor. Appl. Genet.* **79**: 461-464.
- POGGIO, L.; ROSATO, M.; MAZOTI, L.B.** 1997. Variable meiotic behavior among plants of alloplasmic line of maize. *Cytologia* **62**:271-274.
- POGGIO, L.; ROSATO, M.; NARANJO, C.** 1996. Meiotic behavior and DNA content in alloplasmic lines of maize. *Genome* **40**:723-729.
- POGGIO, L.; ROSATO, M.; CHIAVARINO, M.; NARANJO, C.** 1998
- PRICE H.J.** 1988. Nuclear DNA content variation with angiosperm species. *Evol.Trends Plants* **2(1)**:53-60.
- PROVAN, J.; LAWRENCE, P.; YOUNG, G.; WRIGHT, F; BIRD, R.; PAGLIA, G.; CATTANARO, F.; MORGANTE, M.; POWELL, W.** 1999. Analysis of the Genus *Zea* (Poaceae) using polymorphic chloroplast simple sequence repeats. *Plant Systematics and Evolution* **218**:245-256.
- PUERTAS, M.J.; GIRALDEZ, R.,** 1979. Meiotic pairing in haploid rye. *Genet. Iber.* **30-31**:39.47.
- RAMESHA, M.S.; SACHAN, J.K.S.,** 1993. Cytoplasmic effect on chromosome pairing in maize-teosinte hybrids. *Maize Genetic Cooperation Newsletter* **67**:85
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.** 2002. Neopolyploid in flowering plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **33**:589-639.
- RHOADES, M** 1942. Preferential segregation in maize. *Genetic* **27**:395-407.
- RHOADES, M** 1951. Duplicate genes in maize. *Am. Nat.* **85**:43-57.

- RHOADES, M** 1978. Genetic effects of heterochromatin in maize. *Maize Breeding and Genetics*, edited by B.D. Walden. Wiley and Sons, New York p. 641-672.
- RILEY, R.** 1960. The secondary pairing of bivalents with genetically similar chromosomes. *Nature* **185**:751-752.
- RILEY, R.; CHAPMAN, V.** 1958. Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. *Nature* **13**:713-715
- RITCHTER, T. ; PRYOR, T. ; BENNETZEN, J.; HULBERT, S.** 1995. New rust resistance specificities associated with recombination in the *Rpl* complex in maize. *Genetics* **141**:373-381.
- ROBBINS, T.; WALKER, E.; KERMICLE, J.; ALLEMAN, M.; DELLAPORTA, L.** 1991. Meiotic instability of the *R-r* complex arising from displaced intragenic exchange intrachromosomal rearrangement. *Genetics* **129**:271-283.
- ROGERS J.S.** 1950. The inheritance of inflorescence characters in maize-teosinte hybrids. *Genetics* **35**:541-548.
- ROSATO, M.; CHIAVARINO, M.; NARANJO, C.; CÁMARA HERNANDEZ, J.; POGGIO, L.** 1998. Genome size and numerical polymorphism for B-chromosome races of maize (*Zea mays* spp. *mays*) Poaceae. *American Journal of Botany* **85**:168-174.
- RUNNING, M.; SCANLON, M.; SINHA, N.** 2000. . *Maize Genetic 2000. And Beyond. The Plant Cell* **12**:829-839
- RUIZ C. J.A.; SÁNCHEZ J.J.; AGUILAR S. M.** 2001. Potential geographical distribution of teosinte in Mexico: a GIS approach. *Maydica* **46**:105-110.
- SALINA, E.A.; NUMEROVA, O.M.; OZCAN, H.; FELDMAN, M.** 2004. Alterations in subtelomeric tandem repeats during early stages of allopolyploids in wheat. *Genome* **47**:860-867.

- SAN MIGUEL, P.; 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.
- SAN MIGUEL, P.; TIKHONOV, A.; JIN, P.S.; MOTCHOULSKAIA, N.; ZAKHARIV, D.; MELAKE-BERHAM, A.; SPRINGER, P.S.; ESWARDS, K.L.; LEE, L.; AVRAMOVA, Z.; BENNETZEN, J.L.** 1996. Nested retrotransposons in the intergenetic regions of the maize genome. *Science* **274**:765-768.
- SÁNCHEZ, J.J.; RUIZ CORRAL, J.A.** 2000. Distribución del teocintle en México. Publicación interna de Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), Mexico.
- SANCHEZ-MORAN, E.; BENAVENTE, E.; ORELLANA, J.** 2001. Analysis of karyotic stability of homeologous-pairing (ph) mutants in allopolyploids wheat. *Chromosoma* **110**:371-377.
- SANTOS, J.L.; LACADENA, J.R.; CERMEÑO, M.C.; ORELLANA, J.** 1984. Nucleolar organizer activity in Wheat-Barley chromosome addition lines. *Heredity* **53-3**:425-429.
- SANTOS, J.L.; ORELLANA, J.** 1983. Pairing competition between identical and homologous chromosome in rye and grasshoppers. *Genetics* **104**:677-684.
- SEARS, E.; OKAMOTO, M.** 1958. Intergenomic chromosome relationships in hexaploid wheat. 10th Int. Cong. Genet. **2**:258-259.
- SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.** 1999. Polyploid: recurrent formation and genome evolution. *TREE* **14(9)**:48-352.
- STEBBINS, G.L.** 1950. *Variation and Evolution in Plant*. Columbia University.
- STEBBINS, G.L.** 1971. *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. E. Arnold, Londres
- SZABÓ, V.M.; BURR, B.** 1996. Simple inheritance of key traits distinguishing maize and teosinte. *Mol. Gen Genetic* **252**:33-41.

- TING, Y.C.** 2005. Spontaneous chromosome inversions of Guatemalan teosintes (*Zea mexicana*). *Genetica* **36-1**:229-242.
- TITO, C.; POGGIO, L.; NARANJO, C.A.** 1991. Cytogenetics studies in the genus *Zea*: DNA content and heterochromatin in species and hybrids. *Theor. Appl. Genet.* **83**:58-64.
- VALLEDOR, L.; HASBÚN, R.; MEIJÓN, M.; RODRIGUEZ, J.J.; SANTAMARÍA, E.; VIEJO, M.; BERDASCO, M.; FEITO, I.; FRAGA, M.; CAÑAL, M.; RODRIGUEZ, R.** 2007. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **91**:75-86.
- VIJENDRA DAS, L.D.** 1970. Chromosome associations in diploid and autotetraploid *Zea mays* L. *Cytologia* **35**:259-261.
- VAUGHAN, H.E.; JAMILENA, M.; RUIZ REJON, C.; PARKER, J.S.; GARRIDO-RAMOS, M.A.** 1993: Loss of nucleolar-organizer regions during polyploid evolution in *Scilla autumnalis*. *Heredity* **71**:574-580.
- WALDEN, D.B.** 1994. In vitro pollen germination. *The Maize Handbook*. Editores Freeling y Walbot. New York. USA.
- WANG, R.L.; STEC, A.; HEY, J.; LUKENS, L.; DOEBLEY J.F.;** 1999. The limits of selection during maize domestication. *Nature* **398**:236-239.
- WANG, J.; LEE, J.; TIAN, L.; LEE, H.; CHEN, M.** 2005. Methods for genome-wide analysis of gene expression changes in polyploids. *Methods Enzimol.* **395**:570-596.
- WANG, J.; TIAN, L.; LEE, J.; LEE, H.; WEI, N.; JIANG, H.** 2006. Genome-wide non additive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploid. *Genetics* **172**:507-517
- WEATHERWAX, P.** 1954. Indian Corn in Old America. The Mc Millan Company New York 245 pag.
- WEBER, A.; CLARK, R.; VAUGHN, L.; SÁNCHEZ-GONZALEZ, J.; YU, J.; YANDELL, B.; BRADBURY, P.; DOEBLEY, J.** 2007. Major

regulatory genes contribute to standing variation in teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*). *Genetics* **177**: 2349-2359.

WEBER, A.; BRIGGS, W.H.; RUCHER, J.; BALTAZAR, B.; SÁNCHEZ-GONZALEZ, J.; FENG, P.; BUCKLER, E.; DOEBLEY, J. 2008. The genetic architecture of complex traits in teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*): new evidence from association mapping. *Genetics* **180(2)**:1221-1232.

WEBER, D.F.; ALEXANDER, D.E. 1972. Redundant segments in *Zea mays* detected by translocations of monoploid origin. *Chromosoma* **39**:27-42.

WHITE, K.P. 2001. Functional genomics and the study of development, variation and evolution. *Nature Reviews*.

www.nature.com/reviews/genetics.

WILKES, H.G. 1979. Mexico and Central America as a centre for the origin of agriculture and the evolution. *Crop Improvement*. Vol. **6**:1-18.

YAMASAKI, M. J. ; TEMAILLO M.; SCHROEDER, S.; SANCHEZ-VILLEDA, H. ; DOEBLEY, J.; GAUT, B.; MCMULLEN, M. D. 2005. A large-scale screen for artificial selection in maize identifies candidate agronomic loci for domestication and crop improvement. *The Plant Cell* **17**:2859-2872.

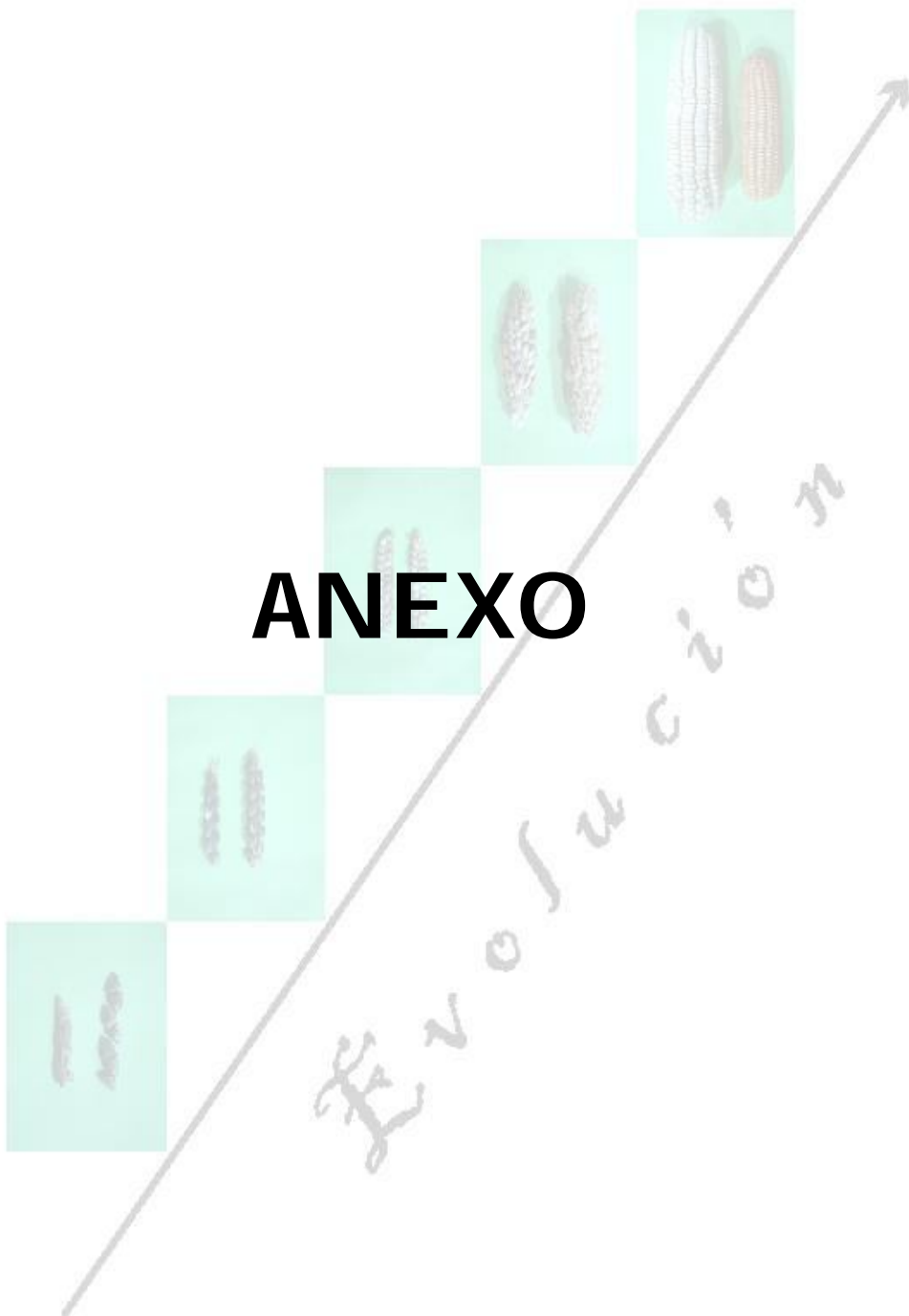
YAMASAKI, M.; WRIGTH, S.I.; MCMULLEN, M. D. 2007. Genomic screening for artificial selection during domestication and improvement in maize. *Ann. Bot.* **100 (5)**:967-973.

YANDEAU NELSON, M.; YIJI, X.; JIN, L.; NEUFFER, M.; SCNABLE, P. 2006. Unequal sister chromatid and homologous recombination and tandem duplication of the *a1* locus in maize. *Genetics* **173**:2211-2226.

YU, H.; HIATT, E.; CHAN, M.; DAWE, K. 1997. Neocentromere mediated chromosome movement in maize. *J. Cell Biol.* **139**:831-840.

- ZHANG, L.; GAUT, B.** 2003. Does recombination shape the distribution and evolution of tandemly arrayed genes (TAGs) in the *Arabidopsis thaliana* genome?. *Genome Res.* **13**:2533-2540.
- ZHANG, L.; PETERSON, T.** 2005. Comparisons of maize *pericarp color 1* alleles reveal paralogous genes recombination and an organ-specific enhancer region. *Plant Cell* **17**:903-914.
- ZHANG, X.; YAZAKI, J.; SUNDARESAN, A.; COKUS, S.; CHAN, S.** 2006. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* **126**:1189-1201.
- ZICKLER, D.; KLECKNER N.** 1998. The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu. Rev. Genet.* **32**:619-697.

ANEXO



1 Técnicas citogenéticas

1.1 Hematoxilina acética

-Hematoxilina 2 gr.

-Ácido acético glacial 45 cc

-Agua destilada 55 cc

-Mezclar con agitación y estacionar 45 días antes de su utilización.

1.2 Carmín acético

-Carmín 2 gr.

-Ácido acético glacial 45 cc

-Agua destilada 55 cc

-Mezclar con agitación y en caso que no se disuelva el carmín calentar sin llegar a ebullición

1.3 Mordiente de citrato férrico

-Agregar cristales de citrato férrico a una solución de ácido acético 45%.

-Calentar hasta disolver los cristales.

-Guardar en frasco color caramelo a temperatura ambiente.

1.4 Buffer ácido cítrico – citrato de sodio, pH 4,8

-Solución A: Disolver 0,84 gr. de ácido cítrico monohidratado en 40 ml de agua destilada estéril (0.1 M)

-Solución B: Disolver 1,76 gr. de citrato trisódico bihidratado en 60 ml. de agua destilada estéril (0,1 M)

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

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

1.5 Solución enzimática de celulasa y pectinasa.

-Solución A: Mezclar 1,6 gr. de celulasa al 2% (Sigma), 16 ml de pectinasa al 20% (v/v) y 64 ml de buffer ácido cítrico-citrato de sodio, pH 4,8.

-Solución B: Mezclar 0,4 gr. de celulasa Ozonuka RS al 2% (p/v), 4 ml de pectinasa al 20% y 16 ml de buffer ácido cítrico-citrato de sodio pH 4,8.

Solución de trabajo: Mezclar 4 partes de la solución A con 1 parte de solución B, agitar en agitador magnético y guardar en tubos tipo "eppendorf" a -20°C.

1.6 Buffer Mc Ilvaine pH 7

-Solución A (0,1 M): Disolver 2,10 gr. de ácido cítrico monohidratado en 100 ml de agua destilada estéril.

-Solución B (0,2 M): Disolver 28,4 gr. de fosfato ácido disódico en 100 ml de agua bidestilada estéril.

En el momento de utilizarla se mezcla 8,8 ml de solución A con 41,2 ml de solución B.

1.7 Solución saturada de Paradiclorobenceno

-Mezclar agua con cristales de Paradiclorobenceno dejándolos en reposo durante 24 h hasta alcanzar la solución el grado de saturación.

1.8 Solución 0,45 mM de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

Pesar 100 miligramos de 2,4-diclorofenoxiacético y diluir en 1.000 ml de agua destilada, guardar en heladera hasta su utilización.

1.9 Solución de $0,5 \times 10^{-4}$ M de colchicina

Pesar 125 miligramos de colchicina Merck y agregar 100 ml de agua destilada, debiéndola utilizar en forma inmediata.

2 Medio de cultivo para la germinación *in vitro* del grano de polen (Walden 1994).

Agar	0,7%
CaCl ₂ .2H ₂ O	300 mg/l
Sacarosa	0,35 M
H ₃ B ₃	100 mg/l

- Ajustar a pH 7 con HONa ó HCl.
- Cocinar en microondas o a baño María evitando que hierva. Cuando este translúcida, envasar en cajas de Petri pudiéndola conservar en heladera hasta 15 días.

3 Medio de cultivo para la regeneración de embriones inmaduros

3.1 Composición del medio de cultivo

El medio básico para el cultivo de embriones inmaduros (tabla 1) estaba compuesta por los macronutrientes y micronutrientes del medio N6 de Chu, (1978), las vitaminas de Haagen y Smit, (1945), con el agregado de 5 % de sacarosa y 8 % de agar.

Tabla 1. Soluciones madres del medio N6, utilizadas para el cultivo de embriones inmaduros de híbridos de *Zea*.

SALES	mg.L ⁻¹	SOLUCIONES MADRE
MACRONUTRIENTES		
MgSO ₄ 7H ₂ O	185	Sn 1 N6 (20X)
KH ₂ PO ₄	400	
KNO ₃	2830	
(NH ₄) ₂ NO ₃	463	
Cl ₂ Ca 2H ₂ O	166	Sn Ca N6 (100X)

MICRONUTRIENTES		
H ₃ BO ₃	1,6	Sn2 N6 (100 X)
MnSO ₄ H ₂ O	3,3	
ZnSO ₄ 7H ₂ O	1,5	
IK	0,8	
FeSO ₄ 7H ₂ O	27,8	Sn Fe-EDTA (100X)
Na ₂ EDTA	37,3	
VITAMINAS		
Glicina	3	Sn Vitaminas embriones (100X)
Tiamina	0,75	
Ac. Ascórbico	20	
Ac. Nicotínico	1	
Vitamina B6 (Piridoxina)	0,2	
Adenina	0,2	
Ac. Pantotenico	0,5	
Biotina	0,0003	
Ac. Succinico	25	

3.2 Procedimiento

3.2.1 Preparación de las soluciones madres

Sales minerales y vitaminas

- Pesar las sales de acuerdo a lo calculado en tabla 1.
- En distintos vasos de precipitación agregar cada una de las sales por separado y disolver por completo con agua destilada.
- En un matraz de 500 ml agregar 100 ó 200 ml de agua destilada y luego incorporar las sales disueltas correspondientes a cada solución madre. Llevarlas a volumen con agua destilada.
- Guardar en botellas de plástico rotuladas y almacenar a una temperatura inferior a 0°C.

3.2.2 Preparación y esterilización del medio de cultivo.

En la tabla 2 se detalla la cantidad de cada una de las soluciones madres del medio N6 (tabla 1) a disolver para obtener 1000 ml del medio de cultivo para desarrollar los embriones inmaduros de *Zea*.

Tabla 2: Volumen de las soluciones madres a agregar para preparar 1000 ml del medio de cultivo para embriones inmaduros de *Zea*.

SOLUCIÓN MADRE	ml de Sn madre para 1 litro de medio
N6 Sn 1 (20X)	50
N6 Sn 2 (100X)	10
N6 Sn Ca (100X)	10
MS Sn 3 (100X)	10
Fe EDTA (100x)	10
Vit. Embriones (100X)	10
Asparagina mg/L	150
Sacarosa 5%	50 g
Agar 0,8%	8 g

- Disolver en una probeta 50 g de sacarosa en aproximadamente 100 ml de agua destilada.
- Agrega a la probeta con la solución de sacarosa cada una de las soluciones madres (tabla 2).
- Llevar a 1000 ml con agua destilada.
- Ajustar el pH a 5,8 con HONa ó HCl.
- Agrega el agar.
- Cocinar en microondas o a baño María, hasta que esta translúcida la solución, envasar en frascos (40 ml por frasco) y esterilizar en autoclave (20 minutos, 120°C a 1 atm).

Con un procedimiento similar se obtuvo el medio de cultivo para el mantenimiento de callos (Tabla 3) y el de enraizamiento (tabla 4)

Tabla 3. Composición del medio de mantenimiento de callos de maíz.

SOLUCIÓN MADRE	ml de Sn madre para 1 litro de medio
N6 Sn 1 (20X)	50
N6 Sn 2 (100X)	10
N6 Sn Ca (100X)	10
MS Sn 3 (100X)	10
Fe EDTA (100x)	10
Vit. Embriones (100X)	10
Asparagina mg/L	150
2,4-D (100ppm)	10
Sacarosa 5%	50 g
Agar 0,8%	8 g

Tabla 4. Composición del medio de enraizamiento de plantas de maíz.

SOLUCIÓN MADRE	ml de Sn madre para 1 litro de medio
N6 Sn 1 (20X)	50
N6 Sn 2 (100X)	10
N6 Sn Ca (100X)	10
MS Sn 3 (100X)	10
Fe EDTA (100x)	10
Vit. Embriones (100X)	10
Asparagina mg/L	150
Sacarosa 5%	50 g
Agar 0,8%	8 g

4 Rescate y cultivo *in vitro* de embriones inmaduros de maíz e híbridos

4.1. Materiales

Espigas de maíz o híbridos.

4.2 Procedimiento

4.2.1 Preparación del material vegetal

Con una tijera de podar o un cuchillo, separar los cariopses de maíz o los híbridos dejándole un trozo de raquis adherido al mismo, para sostenerlo durante la extracción del embrión.

Desinfección

Los cariopses obtenidos en el paso anterior se sumergen en etanol 70% durante 30 segundos.

Enjuagar 3 veces con agua destilada.

Sumergir en lavandina al 20% (V/V) durante 20 minutos.

Enjuagar 4 veces con agua destilada estéril en ambiente aséptico (flujo laminar).

Preparación del explanto

En condiciones asépticas, tomar los cariopses desinfectados y colocar en una caja de Petri con agua estéril. En otra caja de Petri estéril, tomar de a uno los cariopses para proceder a la extracción del embrión. Para ello colocar el cariopse del lado donde se observa la cicatriz del estigma hacia arriba y con un bisturí cortar los lados laterales y terminales del cariopse. Posteriormente levantar el pericarpio dejando al descubierto el endosperma y el embrión, el cual se retira con la punta del bisturí.

Siembra

El embrión se coloca sobre el medio de cultivo, cuidando de no hundirlo en el mismo, con el eje embrionario en contacto con el medio si se desea inducir embriogénesis somática o con el eje embrionario hacia arriba (en este caso el escutelo queda en contacto con el medio de cultivo) si el objetivo es inducir la germinación del mismo.

Incubación

Colocar los embriones sembrados en una cámara de cultivo con un fotoperíodo de 16 h y una intensidad de luz de $80 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y a una temperatura de 25°C .

Aclimatación y trasplante

Cuando las plantas desarrollaron en el medio de cultivo de enraizamiento sus raíces verdaderas, extraerlas del medio de cultivo para trasplantarlas a tierra.

Para evitar las contaminaciones que provoca la muerte de las plantas, se las extrae del medio de cultivo se lavan sus raíces en un chorro de agua corriente hasta eliminar todo el medio. A continuación se las planta en una maceta con lombriz compuesto y se las riega con una solución del funguicida (Super Carbandacin).

Las macetas se llevan a un invernadero y se las mantiene bajo cubierta individual de polietileno durante una semana. Luego de 15 días se trasplantan al suelo.