

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE
VALENCIA**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL



**UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA**

**ESTUDIOS CITOGENÉTICOS
EVOLUTIVOS DEL GÉNERO *ZEA***

Tesis doctoral presentada por:

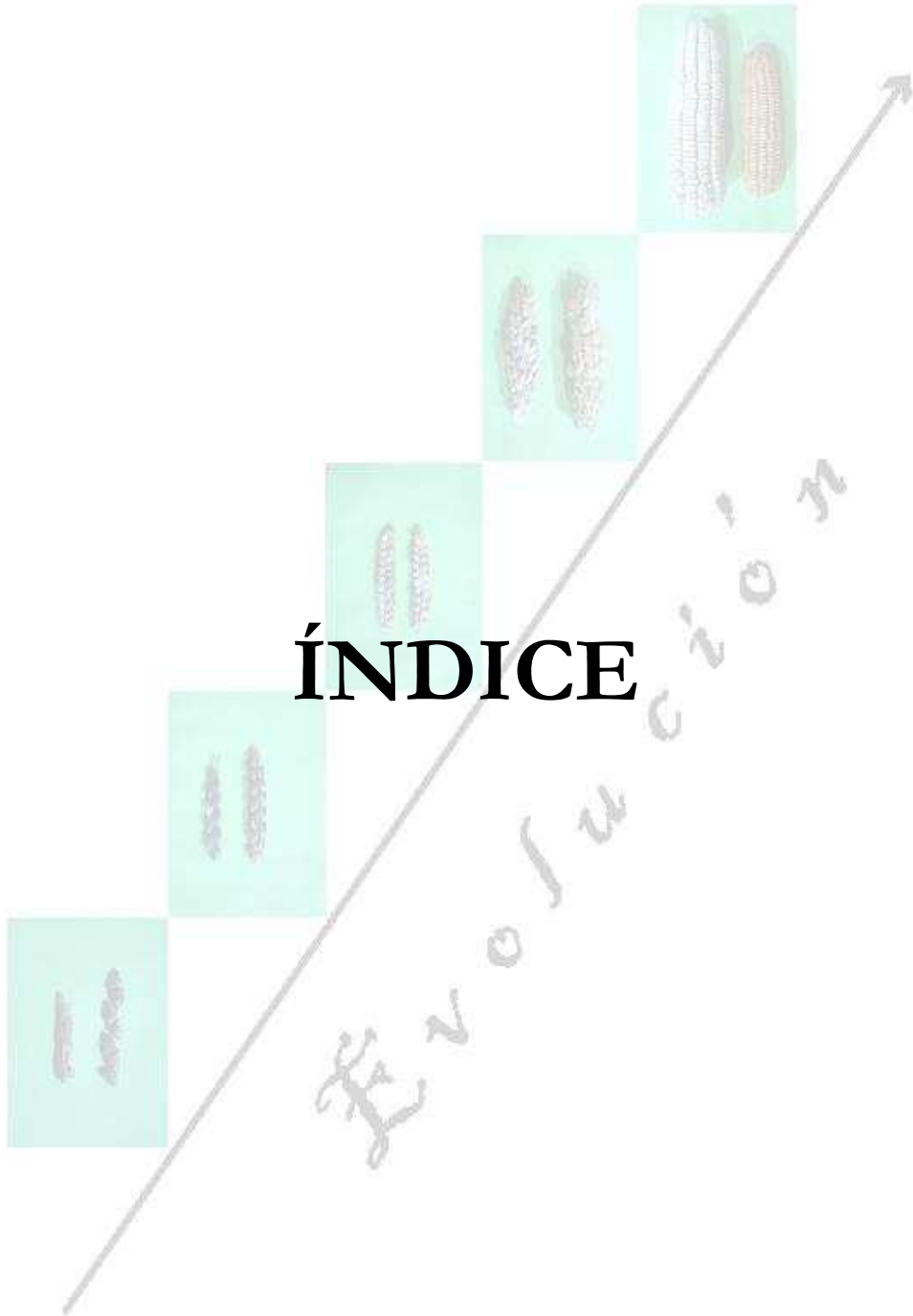
Ing. Agr. María del Carmen Molina

Dirigida por:

Dr. Vicente Moreno Ferrero

2011

ÍNDICE



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 cromosómico 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 (ZmxZpar30) 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> (5IV+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 x 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 x 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 x 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

