

APORTES DE LA CITOGENÉTICA MOLECULAR AL ANÁLISIS DE DIVERGENCIAS GENÓMICAS CRÍPTICAS EN EL GÉNERO *ZEa* (POACEAE)*

LIDIA POGGIO^{1,2,3}, VIVIANA CONFALONIERI^{1,2}, GRACIELA GONZÁLEZ^{1,2},
CECILIA COMAS^{1,2} y CARLOS A. NARANJO¹

Summary: Contributions of molecular cytogenetics to the analysis of cryptic genomic divergences in the genus *Zea* (Poaceae). Fluorescent in situ Hybridization (FISH) is a tool which combined with Genomic in situ Hybridization (GISH) reveals homologies in DNA, mainly in regard to repetitive sequences. There exist strong evidences that *Zea mays* ssp. *mays* ($2n = 20$) and its related wild species are of polyploid origin ($x = 5$). However, the question of which species should be considered as the ancestral ones are still under discussion. GISH studies by other research workers using as probes co-generic species and even genera related to *Zea* failed to reveal genomic differences. In the present work, we have applied these techniques but considerably increasing the astringency of washing after hybridization and using non-marked total genomic DNA as blocking agent. Thus, only are displayed chromosome regions highly homologous with the marker probe. Our experiments of DNA hybridization between *Zea mays* ssp. *mays* and *Z. perennis*, *Z. mays* ssp. *mays* and *Z. mays* ssp. *parviglumis*, *Z. luxurians* and *Z. perennis* by means of this procedure allowed to discriminate several regions of divergence in the repetitive DNA. These results would indicate that FISH used under conditions of maximum astringency and with adequate blocking agents can provide valuable information about the type and localization of repetitive sequences in maize and related species, and also affording important clues concerning evolutionary affinities and divergences.

Key words: *Zea*, maize, teosintes, *in situ* hybridization, FISH, GISH, repetitive DNA.

Resumen: La técnica Hibridación *In Situ* Fluorescente (FISH) utilizando sonda de ADN genómico total (GISH) revela homologías del ADN, principalmente en lo que respecta a las secuencias repetidas. Existen fuertes evidencias de que el maíz ($2n = 20$) y especies silvestres con él relacionadas son poliploides ($x = 5$); sin embargo, aún existen controversias acerca de cuáles fueron las especies progenitoras. Estudios con GISH realizados por otros autores, utilizando como sondas especies congénicas y de géneros relacionados con el maíz, no lograron discriminar los probables genomas parentales. En este trabajo se utilizó GISH aumentando la astringencia en los lavados posteriores a la hibridación y usando como bloqueador ADN genómico total no marcado, de especies relacionadas, de modo que quedaran expuestas sólo las zonas cromosómicas que fueran altamente homólogas a la sonda marcada. De esta manera pudieron discriminarse zonas con distinto grado de divergencia en el ADN repetido al hibridar el ADN de maíz (*Zea mays* ssp. *mays*) con el de *Z. perennis*, de maíz con *Z. mays* ssp. *parviglumis*, y de *Z. luxurians* con *Z. perennis*. Estos resultados indican que la técnica FISH, en condiciones de máxima astringencia y utilizando bloqueadores adecuados, puede ofrecer información acerca del tipo y localización de secuencias repetidas en maíz y especies relacionadas, aportando datos para revelar afinidades y divergencias.

Palabras clave: *Zea*, maíz, teosintes, hibridación *in situ*, FISH, GISH, ADN repetido.

INTRODUCCIÓN

En 1945 se postuló por primera vez que el maíz tendría un origen poliploide, hipótesis ésta que se

basaba fundamentalmente en el hecho que especies de géneros relacionados como *Coix* y *Sorghum* se caracterizaban por poseer $2n = 10$ cromosomas y por consiguiente, $x = 5$ como número cromosómico básico (Anderson, 1945; Darlington, 1956). Estudios citológicos posteriores dieron sustento a esta teoría, siendo los más representativos el apareamiento cromosómico descrito en la meiosis de maíz haploide (McClintock, 1933; Ting, 1985), la asociación secundaria de bivalentes (Vijendra Das, 1970) y los estudios de reconstrucción de cortes seriados de la metafase mitótica (Bennett, 1984).

*Dedicado al Prof. Dr. Juan H. Hunziker en ocasión de su 75º aniversario.

¹Centro de Investigaciones Genéticas (CONICET-UNLP-CIC) - Instituto Fitotécnico de Santa Catalina (FCAF, UNLP) C.C. 4, 1836 Llavallol, Buenos Aires, Argentina.

²Departamento de Ciencias Biológicas (FCEN, UBA).

³Autor para correspondencia, tel.-fax: 054 1 4298 1566, e-mail: canaranjo@ciudad.com.ar

Nuestro grupo de investigación ha realizado numerosos estudios meióticos en especies e híbridos intra- e interespecíficos del género *Zea*, que reforzaron dicha teoría y permitieron proponer que el maíz y las especies relacionadas del género son poliploides de origen antiguo. Los principales hallazgos fueron: a) La configuración meiótica más frecuente en diferentes híbridos interespecíficos con $2n = 30$ cromosomas es $5III + 5II + 5I$; b) la asociación secundaria de bivalentes; c) la presencia de dos grupos de $5II$ en las especies progenitoras y con mayor frecuencia en híbridos y líneas aloploídicas; d) asincronía meiótica de estos grupos, es decir el desfase en la progresión de los estadios meióticos de un grupo respecto al otro (Molina & Naranjo, 1987; Naranjo *et al.*, 1990; Poggio & Naranjo, 1995; Poggio *et al.*, 1997a, b, 1998) y e) formación de multivalentes al realizar tratamientos con soluciones diluidas de colchicina (probablemente como resultado de perturbaciones en el mecanismo de formación de II), revelándose en consecuencia homeologías crípticas entre distintos genomas (Naranjo *et al.*, 1994; Poggio *et al.*, 1990). Estos resultados indicaron, además, que el maíz y especies relacionadas poseen un comportamiento diploidizado en su meiosis, el cual podría estar determinado por la presencia de un gen semejante al gen *Ph* del trigo (Jackson & Murray, 1983; Naranjo *et al.*, 1994; Poggio *et al.*, 1990). Las fórmulas genómicas de los taxa del género *Zea* elaboradas sobre la base de los estudios recién mencionados se representan en la Fig. 1.

Evidencias sobre el origen poliploide del maíz fueron aportadas también por otros grupos de investigación, empleando metodologías muy diferentes, como, por ejemplo, el análisis isoenzimático (Helentjaris *et al.*, 1988; Wendel *et al.*, 1986) y el estudio de grupos de ligamiento a partir de marcadores moleculares (Moore *et al.*, 1995; Gaut & Doebley, 1997). En este último caso, los mapeos comparativos y el análisis de secuencias duplicadas indicaron que el maíz sería un aloploiploide segmentario cuyos dos genomas han experimentado mutuos reordenamientos. Estas conclusiones corroboraron nuestros resultados previos obtenidos en maíz (Poggio *et al.*, 1990), que revelaron la naturaleza segmentaria del aloploiploide a partir de la utilización de soluciones diluidas de colchicina.

Sin bien existen fuertes evidencias a favor de la naturaleza poliploide del maíz, hay todavía controversias acerca de cuáles fueron sus especies

progenitoras. Varias teorías han sido elaboradas al respecto, sugiriendo distintos antecesores o combinaciones híbridas que involucran a géneros afines como *Coix*, *Sorghum* y *Tripsacum* (Doebley, 1990; Gaut & Doebley, 1997); o sosteniendo también que el maíz derivaría por domesticación de especies silvestres de *Zea* (*Z. mays* ssp. *parviglumis*) (Doebley, 1990, 1992). Otras teorías, por el contrario, sostienen que las características morfológicas básicas del maíz existían antes de la domesticación, postulando un maíz primitivo (Cámara Hernández & Gambino, 1990; Mangelsdorf, 1986; Wilkes, 1989).

Nuestra hipótesis es que el maíz y los teosintes no derivaron unos de otros, y que su afinidad se debería a la existencia de antecesores comunes a nivel diploide, extinguidos actualmente; por lo tanto, los representantes modernos del género *Zea* serían producto de un complejo proceso evolutivo (Naranjo *et al.*, 1990). Sin embargo, para corroborar las diferentes hipótesis mencionadas deberían seguir explorándose en forma exhaustiva las relaciones entre las especies de *Zea* y los géneros afines.

La técnica FISH resultó ser enormemente valiosa en relación con el conocimiento de la estructura, función, organización y evolución de genes y genomas. La técnica GISH (Hibridación *In Situ* utilizando como sonda ADN Genómico total) revela homologías específicas del ADN, principalmente en lo que respecta a secuencias repetidas (Bennett, 1995). El ADN repetido es el mayor componente del genoma en la mayoría de los eucariontes. En maíz, por ejemplo, el genoma está dominado por elementos repetidos, siendo la mayoría de éstos del tipo disperso (como, por ejemplo, retroelementos), los que ocuparían el 33-62% del genoma (SanMiguel & Bennetzen, 1998; Kubis *et al.*, 1998).

En el género *Zea* existen variaciones intra e interespecíficas en el tamaño del genoma. Su valor ($2C$) en especies con $2n = 20$ oscila, en líneas y razas argentinas de maíz, entre 4,9 y 6,9 pg (ca. 5700 Mpb) y es de 9,2 pg (8878 Mpb) en *Z. luxurians*. En *Z. perennis* ($2n = 40$) el valor es $2C = 11,5$ pg; 11097,5 Mpb) y posee el menor contenido de ADN por genoma básico (Laurie & Bennett, 1985; Tito *et al.*, 1991; Poggio *et al.*, 1998). Estas variaciones, tanto inter-como intraespecíficas se deberían principalmente a diferencias en la heterocromatina, reveladas por bandeado C y DAPI, que corresponderían a secuencias repetidas "en tandem" (Tito *et al.*, 1991; Rosato *et al.*, 1998; Poggio *et al.*, 1998). Sin embargo, tanto este tipo de ADN repetido "en tan-

Especies e híbridos

Materiales sin tratar

Con tratamiento de colchicina

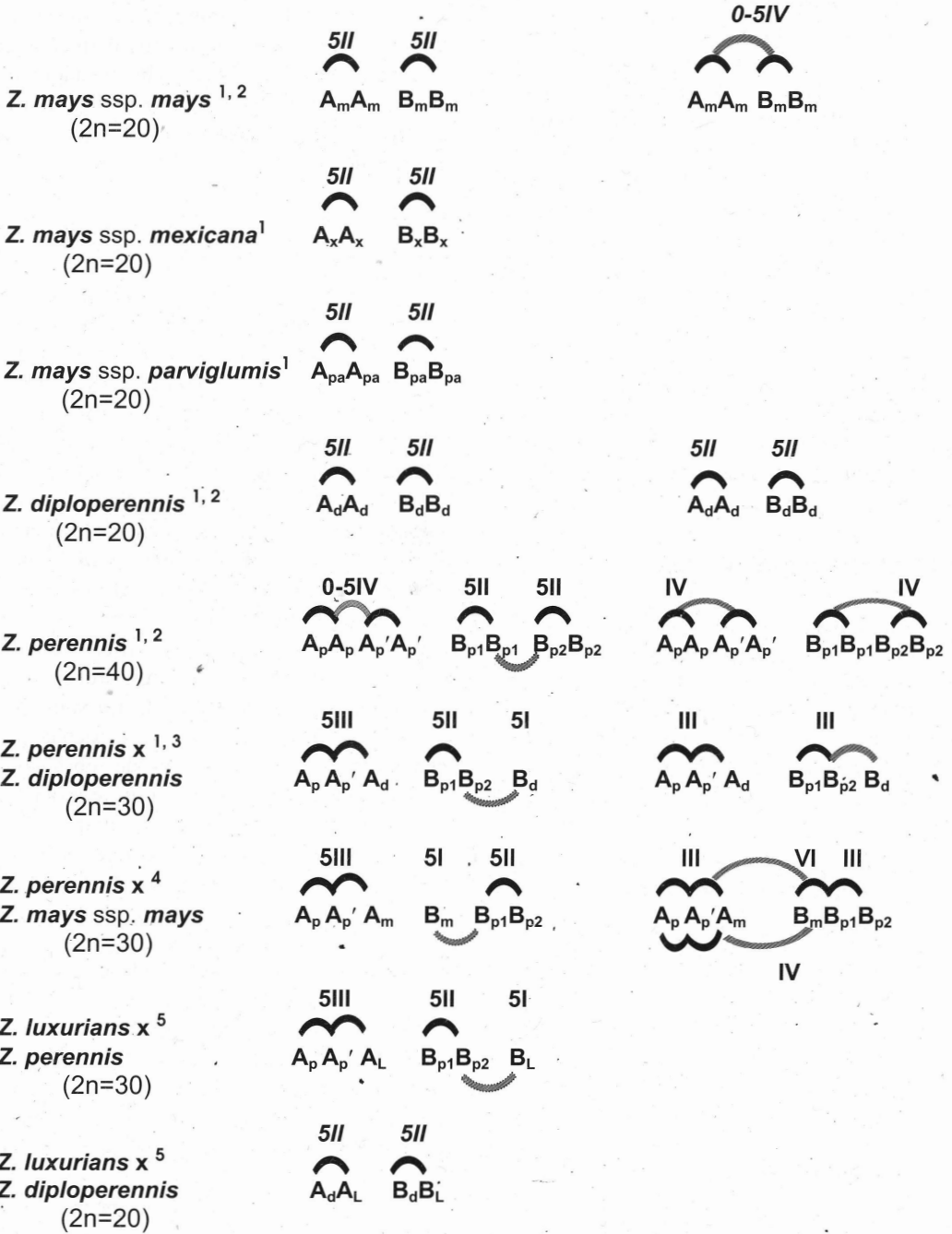


Fig. 1. Formulas genómicas y configuraciones meióticas en especies de *Zea* e híbridos con y sin tratamiento de colchicina. **En materiales sin tratar:** los arcos negros superiores muestran las asociaciones meióticas mas frecuentes, los arcos grises indican las asociaciones meióticas con baja frecuencia. **En materiales tratados:** los arcos grises indican las nuevas configuraciones observadas. Datos tomados de: 1 = Molina & Naranjo, 1987; Naranjo *et al.*, 1990. 2 = Poggio *et al.*, 1990. 3 = Naranjo *et al.*, 1994. 4 = Poggio & Naranjo, inédito. 5 = Poggio *et al.*, 1998; Poggio *et al.*, 1999b.

dem”, como así también el “disperso” correspondiente a los retrotransposones, pudieron haber experimentado amplificaciones y diversificaciones durante la evolución de las especies del género *Zea*. La técnica GISH es en la actualidad, la herramienta adecuada para revelar tales amplificaciones y divergencias. Esta técnica puede discriminar en forma directa aquellos genomas que presentan secuencias tan divergentes que no existe hibridación cruzada entre ellas. Sin embargo, en los casos en que la divergencia sea leve, pueden aplicarse a la técnica algunas modificaciones que tienen mayor probabilidad de éxito en lo que respecta a la identificación de los genomas. Dichas modificaciones se relacionan con el nivel de astringencia en la hibridación y con la utilización de secuencias “bloqueadoras”. En este trabajo describiremos resultados obtenidos aplicando estas modificaciones, señalando su importancia como reveladoras de divergencias genómicas crípticas en el género *Zea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron plantas de *Zea perennis* proveniente de Jalisco, Ciudad Guzmán, México, leg.: Dra. Prywer; cultivadas en el Instituto Fitotécnico Santa Catalina (IFSC) desde 1962; *Zea luxurians* de Guadalajara, México (cult. N° 2228, IFSC); *Zea mays* ssp. *parviglumis* (Balsas, cult. 6836, IFSC) y razas argentinas y/o líneas de *Zea mays* ssp. *mays* cultivadas en el IFSC.

Obtención de preparaciones de cromosomas

Las semillas fueron colocadas en cápsulas de Petri conteniendo papel de filtro embebido en agua destilada para su germinación. Las raíces fueron pretratadas en una solución de 8-hidroxiquinoleína (0.02M) durante 3 hr a 20° C y fijadas en una solución de alcohol etílico absoluto-ácido acético (3:1). Los ápices radicales se lavaron en buffer (ácido cítrico-citrato de sodio 0.01 M, pH 4.6) antes y después de ser tratados con una solución enzimática conteniendo 2% de celulasa (Onozuka R10, Merck) y 20% de pectinasa (SIGMA P4716) durante 30 min a 37° C. Finalmente, se realizó el aplastado del material sobre una gota de ácido acético (45%) en un portaobjetos. Luego se remover el cubreobjetos por congelamiento, los preparados fueron secados al aire.

Obtención y marcado de sondas

La extracción de ADN genómico total se realizó a partir de hojas de individuos adultos según Maniatis *et al.* (1982) con mínimas modificaciones. El ADN se rompió en fragmentos pequeños con sonicador a fin de utilizarlo como bloqueador y para proceder a su marcado, el cual se realizó con Dig High Prime Kit y Biotin Nick Translation Kit (Boheringer Mannheim, Germany), según instrucciones del fabricante.

Hibridación in situ fluorescente (FISH)

La técnica se realizó según Cuadrado & Jouve (1995) con modificaciones. Los preparados fueron pretratados con una dilución 1:100 de RNasa (10 mg/ml) en 2xSSC (citrato sodico-ClNa), incubados con p-formaldehído 4% (p/v) (10 min.), lavados 3 veces en 2xSSC (5 min. cada uno), deshidratados mediante una serie alcohólica y secados al aire. Para la mezcla de hibridación se colocaron en un microtubo: 15 µl de formamida pura, 6 µl de sulfato de dextrano, 3 µl de buffer 20xSSC, 1 µl de SDS 10%, 1 µl de ADN de salmón, y 100-200 ng de ADN marcado. En los casos en que se realizaron bloqueos genómicos se utilizó ADN competidor sin marcar en una relación 30:1 con respecto a la sonda marcada. La solución se desnaturalizó a 70° C (15 min.) y se colocó en hielo. Se añadieron 30 µl de la mezcla de hibridación a cada preparación y se llevaron a un termociclador cuyos ciclos fueron: 7 min. a 75° C, 30 seg a 55° C, 1 min. a 45° C, 2 min. a 42° C, 5 min. a 40° C, 5 min. a 38° C y luego en estufa a 37° C en cámara húmeda durante 12 hs. Los lavados posteriores a la hibridación se realizaron en condiciones de alta astringencia y con agitación: 2xSSC a 42° C (5 min.), formamida deionizada al 20% (v/v) en 0,1xSSC a 42° C (10 min.), 0,1xSSC a 42° C (5 min.), 4xSSC/Tween (0,2%) a 42° C (5 min.) y 4xSSC/Tween (0,2%) a 20° C (5 min.). En cada preparación se colocaron 100 µl de buffer de detección: BSA (albúmina bovina) al 5% (p/v) en 4xSSC/Tween, y se incubaron a 25° C (5 min.). La detección se realizó agregando a cada preparado 50 µl de una solución 2% (v/v) de antidigoxigenina FICT (verde) en BSA 5% y/o Streptavidina Cy3 (rojo), 0,32% (v/v) en BSA 5%, para sondas marcadas con digoxigenina y biotina respectivamente. Los preparados fueron incubados a 37° C en cámara húmeda y

en oscuridad (1 hr) y lavados 3 veces en 4xSSC/Twen 0,2% a 25° C en oscuridad (10 min.). Finalmente fueron tratados con 100 µl de 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI) (1 µg/ml en buffer citrato McIlvaine pH7)(30min), lavados rápidamente en 4xSSC y montados con VectaShield antifade (Vector). El examen de los preparados se efectuó en un microscopio epifluorescente (Axiophot Carl Zeiss) con los filtros adecuados (Carl Zeiss) y fotografiados usando una película Kodak color G400.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Modificación en la astringencia de la hibridación

En un experimento de hibridación en que se utilizó una sonda de ADN genómico total de *Z. perennis* sobre cromosomas mitóticos de *Z. mays* ssp. *mays*, cuando los lavados posteriores a la hibridación se realizaron a 37°C se observó una fluorescencia uniforme en todos los cromosomas de maíz, resultado similar al que obtuvieron Takahashi *et al.* (1999). Sin embargo, al optimizar las condiciones de astringencia logramos discriminar zonas cromosómicas de maíz con distintas señales de hibridación (Fig. 2 A-B), lo cual indicaría diferencias de homología entre las secuencias de ambas especies. Es interesante destacar que aunque hay muchos factores que afectan la astringencia, la diferenciación en nuestro caso fue lograda realizando lavados continuos a 42°C posteriores a la hibridación.

Otro experimento con GISH realizado en condiciones similares de astringencia logró también revelar zonas diferenciales en los cromosomas de *Z. luxurians* hibridados con ADN genómico total de *Z. perennis* (Poggio *et al.*, 1999b).

Bloqueo genómico

Otro método para aumentar la especificidad de la sonda genómica y lograr así una mayor discriminación entre las especies es la utilización de bloqueo. Esto significa adicionar altas concentraciones de ADN no marcado de una especie relacionada (especie B) a la especie cuyas células se van a hibridar (especie A), y utilizar como sonda el mismo ADN marcado de la especie a hibridar (especie A). Como consecuencia de esto, el ADN de B de

cadena simple que se encuentra en exceso, hibridará con el ADN de cadena simple de los cromosomas y de la sonda de A, dejando sin hibridar aquellos sitios cromosómicos de A propios de esta especie y que, por tanto, son los únicos que darán señal positiva al hibridar con la sonda marcada de A.

Anamthawat-Jonsson *et al.* (1990) realizaron experimentos de GISH con especies del género *Hordeum*, y encontraron que al utilizar como sonda ADN genómico total de *H. bulbosum* sobre cromosomas del híbrido *H. bulbosum* x *H. vulgare*, ésta hibridaba sobre ambas especies. Sin embargo, al bloquear con ADN de *H. vulgare* no marcado se redujo la hibridación cruzada y lograron discriminar ambos genomas del híbrido.

En el género *Zea*, la utilización de bloqueo en condiciones de alta astringencia permitió visualizar patrones de diferenciación en los cromosomas. En un experimento de GISH pudimos discriminar los cromosomas de *Z. luxurians* y *Z. perennis*. Para lograr esto trabajamos sobre cromosomas de *Z. luxurians*, bloqueando con ADN no marcado de *Z. perennis* e hibridando con ADN marcado de *Z. luxurians* (Fig. 2 E, F). Las señales intensas que se observan en las zonas teloméricas son propias de *Z. luxurians* y se corresponden en gran parte con la secuencia knob (repetición de 180 pb descrita por Dennis & Peacock, 1984) (Poggio *et al.*, en prensa). Poder discriminar los cromosomas de *Z. luxurians* y *Z. perennis* nos permitió realizar la misma experiencia en la meiosis del híbrido *Z. luxurians* x *Z. perennis* (2n = 30), y analizar la naturaleza de las configuraciones meióticas del mismo (Poggio *et al.*, 1999b).

Otro ejemplo interesante lo constituye los resultados obtenidos al utilizar como blanco cromosomas de *Z. mays* ssp. *parviglumis*, bloquearlos con ADN no marcado de maíz "knobless" (ausencia de knobs), e hibridar con ADN marcado de *Z. mays* ssp. *parviglumis*. En este caso se evidencian claramente a) zonas no hibridadas, que por la naturaleza del experimento se corresponden con zonas altamente homólogas entre maíz y *Z. mays* ssp. *parviglumis*, b) zonas hibridadas de modo uniforme, que serían zonas propias de *Z. mays* ssp. *parviglumis* y c) zonas hibridadas intensamente, que se corresponden con la secuencia knob altamente repetida que no fue bloqueada porque se utilizó una línea de maíz "knobless" (Fig. 2 C-D).

Estos resultados sugieren que entre las distintas

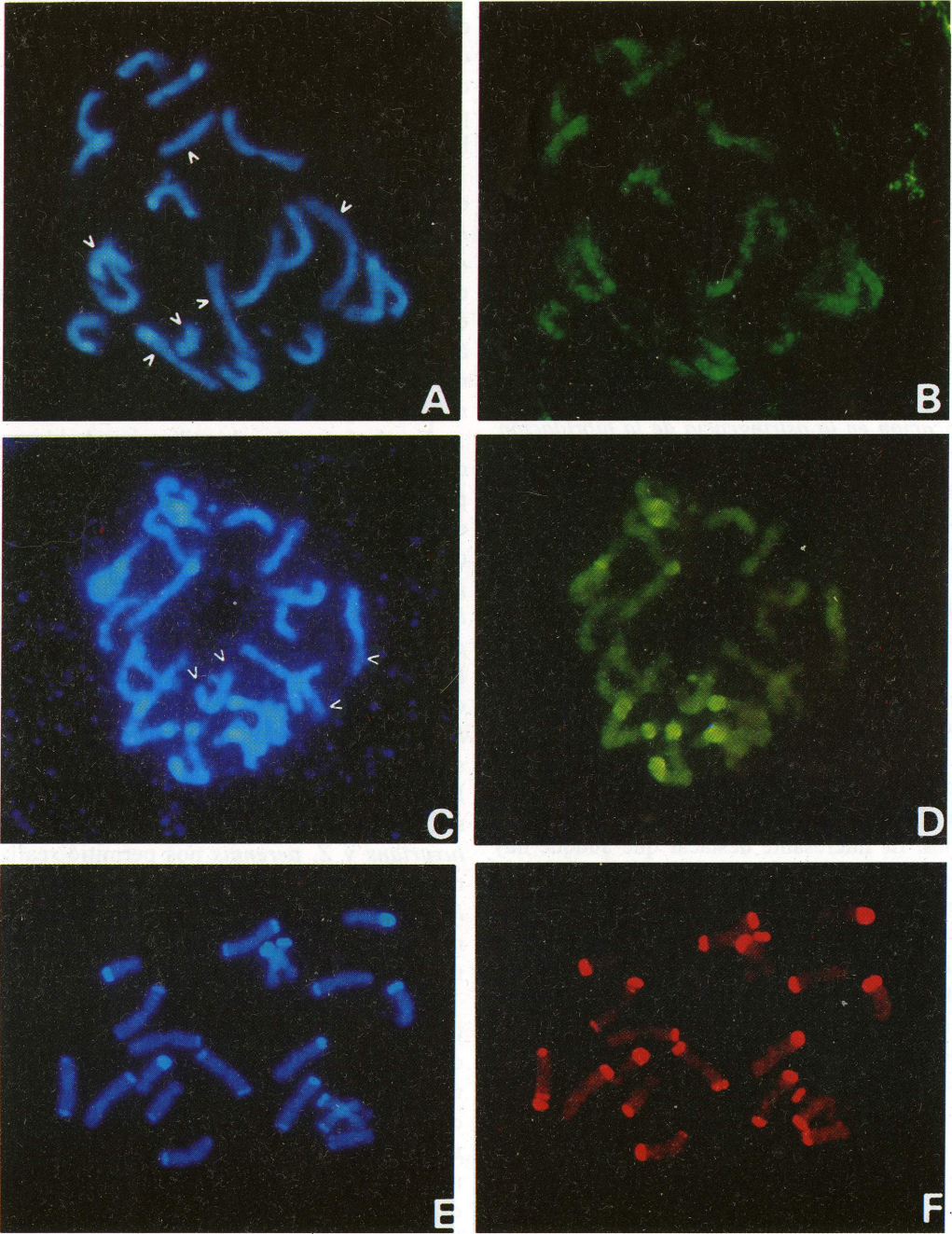


Fig. 2. A-B: Cromosomas de maíz. **A:** DAPI, se señalan los 6 cromosomas que no hibridaron en **B.** **B:** GISH con sonda de ADN genómico total de *Z. perennis* marcado con digoxigenina revelado con antidig FITC: 6 cromosomas no hibridan en su totalidad, en el resto no hibridan las zonas "knobs" y otras zonas terminales e intersticiales. **C-D:** Cromosomas de *Z. mays* ssp. *parviglumis*. **C:** DAPI. **D:** GISH, bloqueado con ADN no marcado de maíz "knobless" (ausencia de knobs), e hibridado con ADN marcado de *Z. mays* ssp. *parviglumis*: Se observan zonas no hibridadas (algunas se señalan en **C**), que corresponden a zonas altamente homólogas entre maíz y *Z. mays* ssp. *parviglumis*, zonas hibridadas de modo uniforme y suave, que serían propias de *Z. mays* ssp. *parviglumis* y zonas hibridadas intensamente que se corresponderían con la secuencia knob altamente repetida, la que no fue bloqueada porque se utilizó una línea de maíz "knobless" como bloqueador. **E-F:** cromosomas de *Z. luxurians*. **E:** DAPI. **F:** GISH, bloqueado con ADN no marcado de *Z. perennis* e hibridado con ADN de *Z. luxurians* marcado con biotina y revelado con streptavidina Cy3: las zonas teloméricas propias (hibridadas) de *Z. luxurians* resaltan en rojo. La escala equivale a 10 μ m.

especies del género *Zea* existirían diferencias en secuencias repetidas. Las mismas son a veces tan sutiles que impiden que sean detectadas mediante las técnicas convencionales de FISH. Estas diferencias podrían constituir un indicio de que los antecesores de *Zea* diferían en el ADN repetido. Las zonas divergentes reveladas en nuestros experimentos aplicando las modificaciones técnicas descriptas, no se distribuyen sobre genomas enteros (p.ej. sobre 10 cromosomas; Fig. 2 A-D), y podrían constituir un relicto de diferencias de genomas ancestrales que habrían sufrido un proceso de reestructuración y/o evolución coincidente incompleta. Podemos concluir entonces que la técnica FISH, en condiciones de máxima astringencia, combinada con técnicas de bloqueo, brinda una valiosa información acerca del tipo y localización de secuencias repetidas divergentes en el género *Zea*, aportando datos para la resolución de su origen.

AGRADECIMIENTOS

Los autores, discípulos del Profesor Dr. Juan H. Hunziker, adhieren al homenaje en reconocimiento a su ejemplar trayectoria y su magnífica obra científica. Agradecemos al Profesor Dr. Ovidio Núñez la lectura crítica del manuscrito. Este trabajo ha sido realizado gracias a los subsidios otorgados por el CONICET, AGENCIA (APCyT: Proyectos 4443 y 2347) y Universidad de Buenos Aires (Proyecto TW01).

BIBLIOGRAFÍA

- ANAMTHAWAT-JONSON, V., T. SCHWARZACHER, A. R. LEITCH, M. D. BENNETT & J. S. HESLOP-HARRISON. 1990. Discrimination between closely related Triticeae species using genomic DNA as a probe. *Theor. Appl. Genet.* 79: 721-728.
- ANDERSON, E. G. 1945. What is *Zea mays*? A report of progress. *Chron. Bot.* 9: 88-92.
- BENNETT, M. D. 1984. The genome, the natural karyotype and biosystematics. In: GRANT, W. F. (ed.), *Plant biosystematics*, pp. 41-66. Academic Press, New York.
- BENNETT, M. D. 1995. The development and use of genomic in situ hybridization (GISH) as a new tool in plant biosystematics. In: BRANDHAM, P. E. & BENNETT, M. D. (eds.), *Kew Chromosome Conference IV*, pp. 167-183. Royal Botanic Gardens, Kew.
- CÁMARA HERNANDEZ, J. & S. GAMBINO. 1990. Ontogeny and morphology of *Zea diploperennis* inflorescences and the origin of maize (*Zea mays* ssp. *mays*). *Maydica* 35: 113-124.
- CUADRADO, A. & N. JOUVE. 1995. Fluorescent in situ hybridization and C-banding analyses of highly repetitive DNA sequence in the heterochromatin of rye (*Secale montanum* Guss.) and wheat incorporating *S. montanum* chromosome segments. *Genome* 38: 795-802.
- DARLINGTON, C. D. 1956. *Chromosome Botany*. Allen and Unwin, London.
- DENNIS, E. S. & W. J. PEACOCK. 1984. Knob heterochromatin homology in maize and its relatives. *J. Mol. Evol.* 20: 341-350.
- DOEBLEY, J. 1990. Molecular systematics of *Zea* (Gramineae). *Maydica* 35: 143-150.
- DOEBLEY, J. 1992. Mapping the genes that made maize. *TIG* 8: 302-307.
- GAUT, B. S. & J. F. DOEBLEY. 1997. DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proceed. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6809-6814.
- HELENTJARIS, T., D. WEBER & E. WRIGHT. 1988. Identification of the genomic locations of duplicate nucleotide sequences in maize of Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Genetics* 118: 353-363.
- JACKSON, R. C. & B. G. MURRAY. 1983. Colchicine-induced quadrivalent formation in *Helianthus*: evidence of ancient polyploidy. *Theor. Appl. Genet.* 64: 219-222.
- KUBIS, S., T. SCHMIDT & J. S. HESLOP-HARRISON. 1998. Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. *Ann. Bot.* 82 (Suppl. A): 45-55.
- LAURIE, D. A. & M. D. BENNETT. 1985. Nuclear content in the genera *Zea* and *Sorghum*. Intergeneric, interspecific and intraspecific variation. *Heredity* 55: 307-313.
- MANGELSDORF, P. C. 1986. The origin of corn. *Scient. Amer.* 254: 80-86.
- MANIATIS, T., E. F. FRITSCH & J. SABROOK. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- McCLINTOCK, B. 1933. The association of non-homologous parts of chromosomes in the midprophase of meiosis in *Zea mays*. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 19: 191-237.
- MOLINA, M. C. & C. A. NARANJO. 1987. Cytogenetic studies in the genus *Zea*. 1. Evidence for five as the basic chromosome number. *Theor. Appl. Genet.* 73: 542-550.
- MOORE, G., K. M. DEVOS, Z. WANG & M. D. GALE. 1995. Cereal genome evolution. Grasses, line up and form a circle. *Curr. Biol.* 5: 737-739.
- NARANJO, C. A., M. C. MOLINA & L. POGGIO. 1990. Evidencias de un número básico $x=5$ en el género *Zea* y su importancia en estudios del origen del maíz. *Monogr. Acad. Nac. Cs. Ex. Fis. Nat., Buenos Aires* 5: 43-53.
- NARANJO, C. A., L. POGGIO, M. MOLINA & E. BERNATENÉ. 1994. Increase in multivalent frequency in F1 hybrids of *Zea diploperennis* x *Z. perennis* by colchicine treatment. *Hereditas* 120: 241-244.

- POGGIO, L., M. C. MOLINA & C. A. NARANJO. 1990. Cytogenetic studies in the genus *Zea*. 2. Colchicine-induced multivalents. *Theor. Appl. Genet.* 79: 461-464.
- POGGIO, L. & C. A. NARANJO. 1995. Cytogenetic analysis of hybrids in *Zea*: evolutionary consideration. 12th International Chromosome Conference, Madrid, Spain, *Chromosome Res.* 3 (Supl. 1): 81.
- POGGIO, L., M. ROSATO, L. B. MAZOTI & C. A. NARANJO. 1997a. Variable meiotic behaviour among plants of an alloplasmic line of maize. *Cytologia* 62: 271-274.
- POGGIO, L., M. ROSATO & C. A. NARANJO. 1997b. Meiotic behavior in alloplasmic lines of *Zea mays* ssp. *mays*. *Genome* 40: 723-729.
- POGGIO, L., M. ROSATO, A. M. CHIAVARINO & C. A. NARANJO. 1998. Genome size and environmental correlations in maize (*Zea mays* ssp. *mays*). *Ann. Bot.* 82 (Suppl. A): 107-115.
- POGGIO, L., V. CONFALONIERI, C. COMAS, A. CUADRADO, N. JOUVE & C. A. NARANJO. 1999a. Genomic "in situ" hybridization (GISH) of *Tripsacum dactyloides* and *Zea mays* ssp. *mays* with B-chromosomes. *Genome* 42: 687-691.
- POGGIO, L., V. CONFALONIERI, C. COMAS, G. GONZALEZ & C. A. NARANJO. 1999b. Genomic affinities of *Zea luxurians*, *Z. diploperennis* and *Z. perennis*: meiotic behaviour of their F1 hybrids and genomic "in situ" hybridization (GISH). *Genome* 42: 993-1000.
- POGGIO, L., V. CONFALONIERI, C. COMAS, G. GONZALEZ & C. A. NARANJO. En prensa. Evolutionary relationships in the genus *Zea*: analysis of repetitive sequences used as cytological FISH and GISH markers. *Gen. Mol. Biol.*
- ROSATO, M., A. M. CHIAVARINO, C. A. NARANJO, J. CÁMARA HERNÁNDEZ & L. POGGIO. 1998. Genome size and numerical polymorphism for B chromosome in races of maize (*Zea mays* ssp. *mays*, Poaceae). *Amer. J. Bot.* 85: 168-174.
- SANMIGUEL, P. & J. L. BENNETZEN. 1998. Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposones. *Ann. Bot.* 82 (Suppl. A): 37-44.
- TAKAHASHI, C., J. A. MARSHALL, M. D. BENNETT & I. J. LEITCH. 1999. Genomic relationships in maize and its wild relatives. *Genome* 42: 1201-1207.
- TING, Y.C. 1985. Meiosis and fertility of anther culture-derived maize plant. *Maydica* 30: 161-169.
- TITO, C., L. POGGIO & C. A. NARANJO. 1991. Cytogenetics studies in the genus: DNA content and heterochromatin in species and hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 83: 58-64.
- VIJENDRA DAS, L. D. 1970. Chromosome associations in diploid and autotetraploid *Zea mays* L. *Cytologia* 35: 259-261.
- WENDEL, J.F., C.W. STUBER, M. D. EDWARDS & M.M. GOODMAN. 1986. Duplicated chromosome segments in maize (*Zea mays* L.) further evidence for hexokinase isoenzymes. *Theor. Appl. Genet.* 72: 178-185.
- WILKES, H.G. 1989. Maize: domestication, racial evolution and spread. In: HARRIS, D. R. & G. C. HILLMAN (eds.), *Foraging and Farming. The evolution of plant exploitation*, pp. 442-455. Unwin Hyman, London.

Recibido el 03 de Noviembre de 2000, aceptado el 24 de Noviembre de 2000.