

I. INTRODUCCIÓN	19
II. MATERIALES Y MÉTODOS	20
III. RESULTADOS	23
IV. DISCUSIÓN	26
V. CONCLUSIONES	28
VI. AGRADECIMIENTOS	28
VII. RESUMEN Y SUMMARY	29
VIII. BIBLIOGRAFÍA	29

POLIMORFISMO DE BANDEO C EN CULTIVARES DE CENTENO ARGENTINO (*Secale cereale* L) *

LUCÍA RAMÍREZ y JUAN RAMÓN LACADENA **

I. INTRODUCCION

En poblaciones naturales, es común, la presencia de uno o varios cromosomas, en dos o más formas estructurales alternativas. Este fenómeno, conocido como *polimorfismo cromosómico*, no se presenta en líneas consanguíneas (líneas puras).

Lacadena (1981), reconoce que el polimorfismo cromosómico, puede detectarse a nivel de población (diferencias entre individuos), a nivel de individuos (diferencia entre células), o a nivel de célula (diferencias entre cromosomas homólogos), características, que deben ser englobadas bajo el concepto de polimorfismo heterocromático, o bien polimorfismo de bandeo (Weimarck, 1975).

Polimorfismo de bandeo entre plantas, y entre cromosomas homólogos de la misma planta, fue demostrado por primera vez, por Vosa (1973) en *Scilla*, y por Marks y Schweizer (1974) en *Anemone* y *Hepática*.

* Versión abreviada de una parte de la Memoria que bajo el título de "Caracterización de cultivares de centeno argentino, mediante técnicas de bandeo C y estudio isoenzimático" fue presentada en la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas. 3 de Diciembre de 1982.

** Jefe de Trabajos Prácticos (D.E.). Cát. Genética, Fac. de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. C.C. 509 - 5000 Córdoba, R. Argentina. Trabajo subsidiado por una Beca del Instituto Iberoamericano de Cooperación Científica y por la Fac. Cs. Agropecuarias. U.N.C. (Setiembre 1980- Diciembre 1982).
Recibido, 14 de Marzo de 1983; Aceptado 21 de Abril de 1983

El bandeo C, en centeno, ha revelado diferencias entre variedades (Sarma y Natarajan, 1973; Verma y Rees, 1974; Gill y Kimber, 1974), pero Weimarck (1975), es la primera que informa sobre el polimorfismo de bandeo a nivel de grupo, planta e individuo, en lo que respecta a presencia-ausencia de bloques teloméricos, y bandas intercalares, como así también al tamaño de los bloques teloméricos heterocromáticos.

Lelley (1978), por su parte, indica variación en el tamaño de los bloques heterocromáticos teloméricos entre líneas, aunque reste importancia a este hecho, debido a la imposibilidad de determinar la cantidad de ADN en dichos segmentos cromosómicos. Denuncia una considerable variación entre líneas en lo que respecta a presencia y tamaño de bandas intersticiales.

Giráldez, et al (1979), estudiando líneas consanguíneas y cultivares de centeno español, detecta que los grandes bloques heterocromáticos presentes en los cultivares, están ausentes en las líneas consanguíneas; asimismo, observan que en los cultivares, existen variaciones en el patrón de bandeo entre plantas y entre homólogos de la misma planta.

II. MATERIALES Y METODOS

MATERIAL:

El material, diferentes cultivares de centeno argentino (*Secale cereale* L.), fue cedido por técnicos de la E.E.R.A. de Pergamino, al Prof. Dr. J. R. Lacadena. Estos cultivares son:

DON ENRIQUE INTA (D.E.)

Ploidía: $2n: 2x: 14$.

Establecimiento creador: E.E.R.A. Anguil (Pvcia. La Pampa).

Técnico creador: Guillermo Covas.

Año inicial de labor: 1695.

Año de difusión: 1965.

Proceso seguido en el Plan de Mejoramiento: selección masal sobre la variedad TROPERO INTA, a través de selección mecánica del grano, repetida anualmente, sembrándose los granos más grandes de tamaño uniforme. (Fig. 1).

MANFREDI SUQUÍA (M.S.).

Ploidía: $2n: 2x: 14$.

Establecimiento creador: E.E.R.A. Manfredi INTA (Pvcia.de Córdoba)

Fitogenético creador: R. Parodi y J. L. Scantamburlo.

Origen genético: selección genealógica lograda sobre una población de centeno común de la localidad de Las Junturas (Pvcia. Córdoba), sobre las selectas 47 y 73.

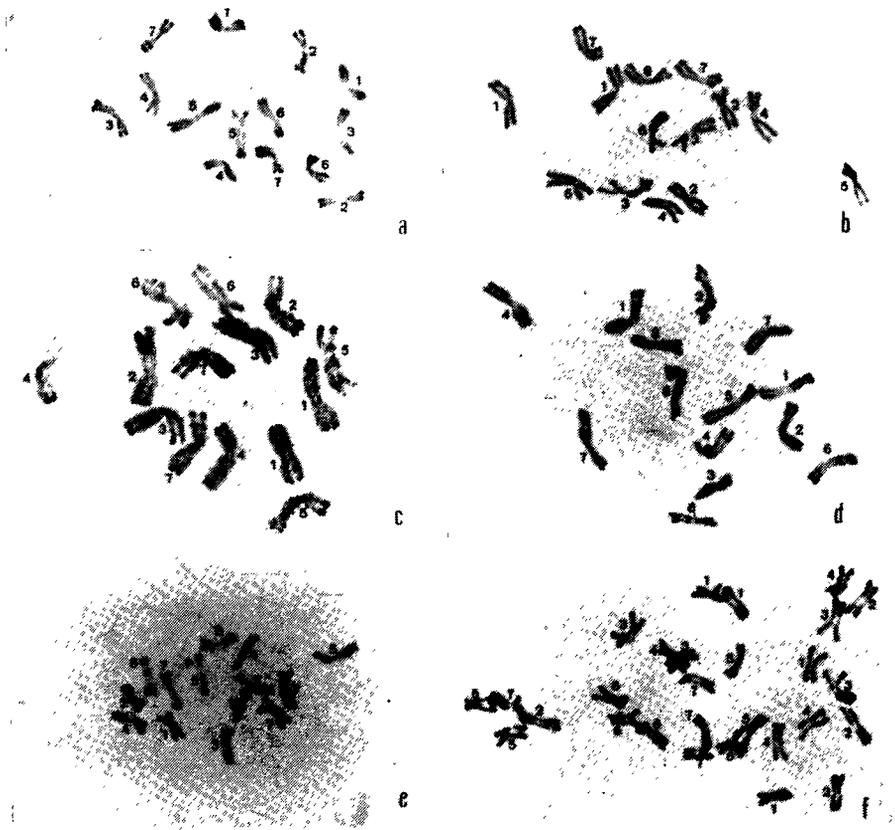


FIG. 1 — a) Placa metafásica del Cultivar L.C. 68/1233; b) Placa metafásica del Cultivar Invernador INTA; c) Placa metafásica del Cultivar Manfredi Suquia (Heterocigoto para el carácter presencia de banda en el brazo largo del cromosoma 3); d) Placa metafásica del Cultivar Selección 70/78; e) Placa metafásica del Cultivar Don Enrique INTA; f) Placa metafásica del Cultivar Tetrapico.

Fecha inicial de selección: 1947.

Primer año de difusión: 1959.

L.C. 68/1233.

Ploidía: $2n: 2x: 14$.

Establecimiento creador: E.E.R.A. Bordenave (Pvcia. de Bs.As.).

Fitogenético creador: Juan Carlos Tomasso.

Origen genético: selección recurrente sobre el cultivar Anguil. (Fig. 1).

INVERNADOR INTA (I.I.).

Ploidía: $2n: 2x: 14$.

Establecimiento creador: Criadero Masseaux-Pirovano (Pvcia. Bs. As.).

Fitogenético creador: Gino Tomé.

Origen genético: cruzamiento entre Pastoreo Masseaux y forrajero Masseaux. (Fig. 1).

TETRÁPICO: (Tp).

Ploidía: $2n: 4x: 28$.

Establecimiento creador: E.E.R.A. Anguil (La Pampa).

Fitogenético creador: Guillermo Covas.

Origen genético: selección recurrente sobre el cultivar tetraploide Anguil.

Obtenido por tratamiento de plántulas de centeno Pico M.A.G., con solución de colchicina al 0,01% (Fig. 1).

SELECCIÓN 70/78:

Ploidía: $2n: 2x: 14$.

No se tienen datos sobre su procedencia. (Fig. 1).

MÉTODOS:

Bandeo C:

Para realizar el bandeo C, de los 6 cultivares de centeno, se siguieron los pasos que enumeramos a continuación:

- Las semillas fueron puestas a germinar, en placas petri, con papel de filtro, humedecido con agua de grifo.
- Las raíces (1-2 cm aproximadamente), fueron cortadas y puestas en tubos de hidrólisis, con agua corriente a $0-2^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas para contraer los cromosomas.
- A continuación, las raíces se fijaron en alcohol acético (3:1).
- Las preparaciones se hicieron mediante la técnica de squash, aplicada a los extremos de las raíces, que se montaron en una gota de ácido acético al 45 %.
- Se separa el portaobjeto del cubreobjeto con nieve carbónica. El material se deshidrata por inmersión en alcohol absoluto durante 24 hs.
- Antes de comenzar el bandeo C, las preparaciones se secan al aire.

Técnica de Bandeo C:

- Las preparaciones secas, se sumergen en ácido clorhídrico (0.2N) durante 4 minutos a 60°C .
- Lavado con agua de grifo.
- Las preparaciones se incuban en una solución de 2xSSC (solución salina de citrato de sodio: cloruro de sodio al 17.55 % y citrato sódico deshidratado al 8.82 %) a 60°C durante 1 hora.
- Posteriormente, las preparaciones se tiñen con una solución de Giemsa (Gurr's R 66) al 3 % en tampón fosfato a pH 7.

- Durante la tinción, se van observando las preparaciones al microscopio, hasta obtener el grado de contraste deseado, tras lo cual, se lavan con agua y secan al aire.
- Las preparaciones teñidas y secas, se sumergen en xilol durante 5 minutos y se montan con DPX para su posterior observación.

IDENTIFICACION CROMOSOMICA Y CARIOTIPADO:

La identificación cromosómica, se realizó, previa fotografía, tomando como modelo, el patrón realizado por Giráldez et al (1979), para líneas consanguíneas españolas, y cultivares de polinización abierta.

Una vez reconocidos, cada uno de los cromosomas, se procedió a confeccionar el cariotipo correspondiente, cuyo análisis permitió estudiar el polimorfismo existente, en todos los cromosomas del complemento de cada cultivar.

III. RESULTADOS

CULTIVAR L.C. 68/1233:

De un total de 38 plantas analizadas, 14 fueron homocigotas para todos los pares cromosómicos, y 24 presentaron polimorfismo a nivel de bloque telomérico del mismo par; apareciendo 2 plantas heterocigotas para el brazo largo del cromosoma 1; 4 heterocigotas para el brazo corto del cromosoma 2; 2 heterocigotas para el brazo largo del mismo; 2 heterocigotas para el brazo largo del 5; 2 heterocigotas para el brazo largo del 6; 4 heterocigotas para el brazo corto de 7; y 4 para el brazo largo del mismo. (Fig. 2).

CULTIVAR INVERNADOR INTA:

El análisis de 44 plantas de este cultivar, nos mostró que 12 de ellas eran homocigotas para todos los pares cromosómicos, y 32 fueron polimórficas, detectándose tal polimorfismo en la heterocigosis que se presenta a nivel del brazo corto del par cromosómico 1, en 4 plantas. Mostraron también heterocigosis, 8 plantas en el brazo corto del par 2; 2 plantas en el brazo corto del 3; 2 en el brazo largo del 3; 6 plantas en el brazo corto del 5; 4 plantas en el brazo corto del 7, y 4 en el brazo largo del mismo. (Fig. 2).

CULTIVAR MANFREDI SUQUÍA:

Al realizar el análisis de plantas de este cultivar, se pudo detectar polimorfismo, a nivel de bloque heterocromático telomérico, como así también, de bloque heterocromático intersticial.

FIGURA 2

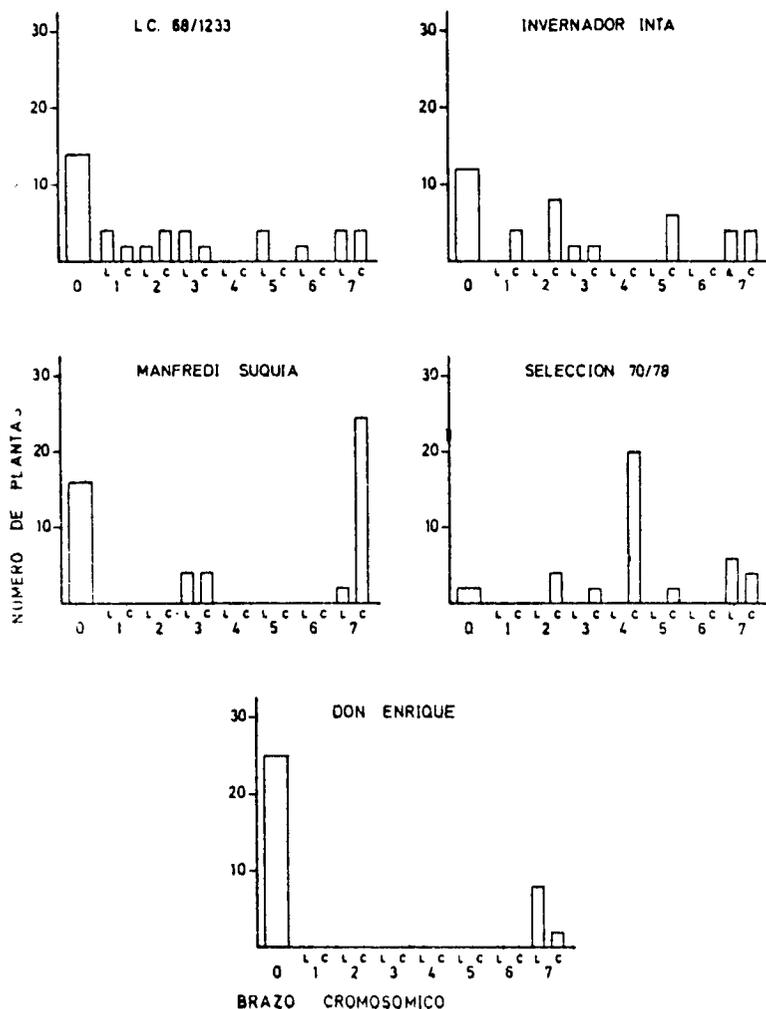


FIG. 2 — Polimorfismo por brazos cromosómicos para cada cultivar. El 0 (cero) indica el número de plantas homocigotas encontradas.

a) *Polimorfismo de bloque heterocromático telomérico:*

De un total de 44 plantas analizadas, sólo 16 fueron homocigotas para todos los pares cromosómicos, observándose 4 plantas heterocigotas para el brazo corto del cromosoma 3 y para el brazo corto del cromosoma 7; 2 para el brazo largo del cromosoma 3 y el brazo corto del 7; 2 para el brazo largo del cromosoma 3, e igual número para el brazo largo del 7; siendo 18 heterocigotas para el brazo corto del 7. (Fig. 2).

b) *Polimorfismo de bloque heterocromático intersticial:*

El análisis de plantas, del cultivar Manfredi Suquía, mostró la presencia de un bloque intersticial en condición homocigota o bien heterocigota; en el brazo largo del par de homólogos 3.

Con el objeto de conocer, si el carácter: presencia-ausencia de banda estaba en equilibrio Hardy-Weinberg, en la población, se realizó la prueba de X^2 pertinente.

Sea B; presencia de banda: p

bb: ausencia de banda: q

BB	Bb	bb	
14	44	48	Total de indiv. analizados: 106.
			N: 106.

$$\frac{D + H/2}{N} : 0.3396$$

$$q: \frac{R + H/2}{N} : 0.6604$$

	BB	Bb	bb
Observados	14	44	48
Esperados	12	48	46

valor de 0.7536; lo que indica que al no ser las diferencias significativas,

La aplicación de la prueba de X^2 con un grado de libertad, toma el el carácter: presencia- ausencia de banda intersticial en el brazo largo del cromosoma 3, está en equilibrio en la población.

SELECCIÓN 70/78:

El estudio de 36 plantas del cultivar Selección, mostró que el mismo presenta mayor polimorfismo; ya que sólo 2 plantas mostraron homocigosis para todos los pares cromosómicos. De las 34 plantas restantes, 2 eran heterocigotas para el brazo corto del cromosoma 2; 2 para el brazo corto del 3; 20 heterocigotas para el brazo corto del 4; 2 heterocigotas para el brazo corto del 5; 4 heterocigotas para el brazo corto del 7; y 4 para el brazo largo del mismo par.

DON ENRIQUE INTA:

Al analizar cariotípicamente este cultivar, se observó, que es menos polimórfico que todos los otros; ya que de 32 plantas observadas, 22 pre-

sentaron homocigosis para todos los pares cromosómicos (de bloques heterocromáticos teloméricos), siendo sólo 10 heterocigotas; de las cuales 2 presentan heterocigosis para el brazo corto del par 7, y 8 heterocigotas para el brazo largo del mismo par.

TETRÁPICO:

Se analizaron 24 plantas de este cultivar, sin detectarse en dicho número polimorfismo evidente, a nivel de bloque heterocromático telomérico ni intersticial.

IV. DISCUSION

Como toda especie alogama, el centeno (*Secale cereale* L.), presenta una marcada variabilidad genética, tanto a nivel interpoblacional, como intrapoblacional. Dicha variabilidad, se traduce en el grado de polimorfismo observado, luego de la identificación y posterior cariotipado de los cromosomas de los diferentes cultivares analizados, según el patrón previamente establecido por Giráldez et al (1979), para líneas consanguíneas españolas y cultivares de polinización abierta.

En cultivares argentinos, se ha observado:

1) Una marcada variación del patrón de bandeo entre plantas de un mismo cultivar, y entre homólogos de la misma planta.

2) Una mayor cantidad de heterocromatina, si se los compara con las líneas consanguíneas españolas, que sirvieron de patrón para la identificación cromosómica.

Respecto al primer punto, si se considera que estas diferencias se presentan en varias plantas de cada uno de los cultivares analizados (excepto en Tetrapico, donde no se observó tal variación), será posible, por tanto, estudiar el polimorfismo de cada cultivar, al analizar la Fig. 2, donde se muestra la heterocigosis (polimorfismo) observado al cariotipar los diferentes cultivares.

El análisis de la Fig. 2, muestra un alto grado de heterocigosis existente en el cultivar Selección 70/78, donde de un total de 36 plantas, sólo 2 eran homocigotas. En las restantes plantas de este cultivar, el polimorfismo, se repartió diferentemente entre todos los cromosomas del complemento, excepto en los pares 1 y 6, que en todos los casos fueron homocigotas.

Comparativamente, el grado de polimorfismo existente entre L.C. 68/1233, e Invernador INTA, es similar. Es at situación, sin embargo, no puede hacerse extensiva a Don Enrique y a Tetrapico, puesto que para el caso de Don Enrique, la heterocigosis se mostró tan solo a nivel del par cromosómico 7 (y en muy pocas plantas). En lo que se refiere al

cultivar Tetrapico, no se observó heterociguidad en las plantas analizadas, sin descartar por eso que exista; ya que el mismo no se ha originado por duplicación con colchicina de plantas homocigotas.

El cultivar Manfredi Suquía, merece especial atención, ya que si bien el grado de heterociguidad existente entre todos los cromosomas del complemento es bajo, el análisis de las diferentes plantas, permitió detectar un prominente bloque heterocromático en el brazo largo del cromosoma 3, tanto en condición homocigótica, como heterocigótica, el cual mostró estar en equilibrio Hardy-Weinberg.

Es digno de mencionar, que en todos los cultivares, en mayor o en menor grado, el cromosoma que siempre apareció como polimórfico fue el cromosoma 7, que es el cromosoma organizador nucleolar en centeno.

Las variaciones que presentan plantas de un mismo cultivar, y homólogos de la misma planta, fueron descritas también por otros autores, quienes han dado posibles explicaciones del fenómeno, que pueden ser aplicadas al material en cuestión:

— Plantas que presentan polimorfismo a nivel de bloques heterocromáticos teloméricos, pueden ser originadas por:

1) Amplificación saltatoria: fenómeno conocido, y responsable del aumento de ADN en segmentos determinados de cromosomas individuales (Bennett, 1977). Esto, sólo puede producirse, en familias de secuencias repetidas idénticas, o muy semejantes, siendo su causa, posiblemente un error en la replicación de una secuencia determinada, que se repetiría ciento y miles de veces (Britten y Kohne, 1968).

2) Divisiones mitóticas, que originen la formación de puentes anafásicos dejando libres los fragmentos heterocromáticos (Gustafson, 1982). Si bien este hecho es muy raro que ocurra, se genera entonces la posibilidad de que el mismo, tenga ventajas selectivas, y que sea fijado en una determinada línea de centeno, cosa que se desconoce.

3) No parece ser un posible origen de polimorfismo heterocromático en centeno, el intercambio de cromátidos que lleven bandas de heterocromatina, ya que Giráldez y Orellana (1979), han demostrado que no se forma quiasmas en tales regiones. A estas conclusiones, llegan, tras analizar la frecuencia de quiasmas en cultivares heterocigóticos para ciertos bloques heterocromáticos.

Sin embargo, Jones (1978), encontró que es posible que se dé un sobrecruzamiento en una región muy cercana a la banda C, y que las secuencias repetidas de la zona límite, sufran intercambio meiótico. Por

tanto, un sobrecruzamiento desigual muy próximo al límite entre la eucromatina y la heterocromatina, puede constituir una fuente de variación en las secuencias repetidas, y por tanto detectable a nivel citológico.

En este momento, cabría preguntarse: ¿Cuál es la causa por la cual los cultivares tienen mayor cantidad de heterocromatina que las líneas consanguíneas? Como en el caso anterior, nos valdremos de la hipótesis pronunciada por Giráldez y Lacadena (1978) quienes sostienen, que quizás una de las causas que determinen la menor cantidad de heterocromatina en las líneas consanguíneas, sean los errores que pudieran ocurrir en el sobrecruzamiento, produciendo los llamados intercambios en "U", y la consiguiente pérdida del bloque heterocromático telomérico.

Hasta el momento, la explicación de porqué los cultivares de polinización abierta tienen mayor cantidad de heterocromatina telomérica que las líneas consanguíneas, es una pregunta sin respuesta.

V. CONCLUSIONES

1) Existe un marcado polimorfismo heterocromático en cultivares de centeno argentino (*Secale cereale* L), premisa que es válida para todos los cultivares estudiados, excepto Tetrapico y Don Enrique, que son los menos polimórficos.

2) La técnica de bandeado C, permite la identificación de cromosomas del complemento de cada cultivar, pero no la identificación de cultivares ya que el polimorfismo cromosómico en ellos es muy semejante, excepto en Tetrapico y Don Enrique, que son los menos polimórficos.

3) La identificación de cultivares, utilizando bandeado C, sólo puede efectuarse en cultivares donde exista algún marcador citológico. Ej.: banda intersticial en el brazo largo del cromosoma 3 en Manfredi Suquía. De lo contrario, esto es prácticamente imposible, ya que en centeno, el patrón de bandeado es repetitivo en todos los cultivares analizados.

VI. AGRADECIMIENTOS

La autora, agradece al Prof. Dr. Juan Ramón Lacadena-Calero, la orientación y dirección de su tesis doctoral. También agradece la incondicional y desinteresada ayuda que en todo momento le brindó el Lic. Gerardo Pisabarro de Lucas, y el estímulo ofrecido por la Ing. Agr. Delia Docampo.

De forma particular, agradece al Personal Docente de las Cátedras de Genética y Mejoramiento Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba.

VII. RESUMEN

Se ha estudiado el polimorfismo presentado por cultivares de centeno argentino (*Secale cereale*, L.), utilizando bando C. Esta técnica, no permite la identificación de los mismos, si no se conoce su procedencia. Sólo es posible su identificación, si existe algún marcador citológico en los cromosomas (Banda intersticial en el cromosoma 3 de Manfredi Suquía), debido al marcado polimorfismo encontrado en los cultivares de centeno argentino.

SUMMARY

Polymorphism in argentinian rye cultivars (*Secale cereale* L.) using C banding was studied. This technic, doesn't allow the identification, if the cultivars origin is unknown. Only cytological markers in chromosomes, allow the identification of cultivars (an intersticial band in chromosome number 3 in Manfredi Suquía cultivar), because the polymorphism in argentinian rye cultivars is very hard.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1 — BENNETT, M. D. 1977. Heterochromatin aberrant endosperm nuclei and grain shrivelling in wheat-rye genotypes. *Heredity* 39: 411-419.
- 2 — BRITTEN, R. J., and D. E. KOHNE. 1968. Repeated sequences in DNA. *Science* 161: 529-540.
- 3 — GILL, B. S., and G. KIMBER. 1974. The Giemsa C-banding karyotype of rye P.N.A.S. 71: 1247-1249.
- 4 — GIRALDEZ, R., and J. R. LACADENA. 1978. Relationships between frequency, localizations and errors in chiasma formation in desynaptic rye. *Chromosoma (Berl)* 66: 193-204.
- 5 — GIRALDEZ, R. and J. ORELLANA. 1979. Metaphase I bonds, cross-over frequency and genetic length of specific chromosome arms of rye. *Chromosoma (Berl)* 72: 377-385.
- 6 — GIRALDEZ, R., M. C. CERMEÑO and J. ORELLANA. 1979. Comparison of C-banding pattern in the chromosomes in inbred lines and open pollinated varieties of rye. *Z. Pflanzenzücht.* 83: 40-48.
- 7 — GUSTAFSON, J. P. 1982. The molecular cytology of wheat rye hybrids. *Int. Rev. of Cytol.* 80: 93-127.
- 8 — JONES, G. H. 1978. Giemsa C-banding of rye meiotic chromosomes and the nature of terminal chiasmata. *Chromosoma (Berl)* 66: 45-47.
- 9 — LACADENA, J. R. 1981. *Genética*. 3 (a) Edición. Madrid, España. Editorial A.G.E.S.A. pp: 1275.
- 10 — LELLEY, T. 1978. Polymorphism in the Giemsa C-banding pattern of rye chromosomes. *Can. J. Genetic. Cytol.* 20: 307-312.
- 11 — MARKS, G. E., and D. SCHWEIZER. 1974. Giemsa banding karyotype differences in some species of *Anemome* and in *Hepatica nobilis*. *Chromosoma (Berl)* 44: 405-416.
- 12 — SARMA, N. P., and A. T. NATARAJAN. 1973. Identification of heterochromatin regions in the chromosomes of rye. *Hereditas.* 74: 233-238.
- 13 — VERMA, S. C., and H. REES. 1974. Giemsa staining and the distribution of heterochromatin in rye chromosomes. *Heredity* 32s 118-122.
- 14 — VOSA, C. G. 1973. Heterochromatin recognition and analysis of chromosome variation in *Scilla sibirica*. *Chromosoma (Berl)* 43: 269-278.
- 15 — WEIMARCK, A. 1975. Heterochromatin polymorphism in the rye karyotype as detected by the Giemsa C-banding technique. *Hereditas.* 79: 293-300.