

Mapeo físico de los genes ribosomales y regiones heterocromáticas en *Arachis glandulifera* (Leguminosae)

Robledo, G. - Seijo, J. G.

Fac. Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET)

Sgto. Cabral 2131 CC 209, CP 2400 Corrientes, Argentina.

seijo@agr.unne.edu.ar

Introducción

Arachis glandulifera es una especie silvestre diploide ($2n = 2x = 20$) nativa del este de Bolivia. Las plantas de esta especie son anuales y se caracterizan, por presentar largas ramas laterales; largos folíolos elípticos con colmos agudos; largos clavos con pelos glandulares; semillas grandes y cajas con la superficie altamente reticulada.

Stalker *et al.* (1991), determinó la fórmula cariotípica de 14 cromosomas metacéntricos (m) + 4 submetacéntricos (sm) + 2 subtelocéntricos (st), con tres pares de metacéntricos presentando satélites en sus brazos cortos, para las accesiones 30098, 30099 y 30100; y 10 m + 8 sm + 4 st, con un par metacéntrico y otro submetacéntrico con satélites, para la accesión 30091. Un único bloque heterocromático se observó en el brazo largo del par 1 de todas las accesiones. Sin embargo, Fernández y Krapovickas (1994), para las accesiones 30098 y 30100 determinaron la fórmula cariotípica: 8 m + 12 st. La presencia de diversos cromosomas subtelocéntricos diferencia a esta especie de las demás incluidas en la sección *Arachis*, ya que las mismas poseen cariotipos con mayoría de cromosomas metacéntricos.

En cruzamientos interespecíficos se han obtenido híbridos en baja frecuencia entre *A. glandulifera* y las especies diploides *A. duranensis* (genoma A) y *A. batizocoi* (genoma B); sin embargo, todas las plantas fueron estériles (Stalker *et al.*, 1991). Si bien la formación de 5-8 bivalentes en células madres del polen de los híbridos demuestran cierto grado de homología entre el genoma de *A. glandulifera* y los de *A. duranensis* y *A. batizocoi*; la frecuencia de quiasmas fue solo comparable a los observados en híbridos AB. Por otro lado, los intentos de cruzamiento con *A. hypogaea* (genoma AABB) han fallado en producir híbridos. Estos datos más los rasgos cromosómicos únicos llevaron designar a *A. glandulifera* como el primer miembro de un nuevo grupo genómico denominado "D".

En el marco de la caracterización genómica de la sección *Arachis* que se realiza en el IBONE, en este trabajo se mapearon secuencias de DNA ribosómico 45S y 5S por FISH y bandas heterocromáticas DAPI+ con la finalidad de comprobar la identidad genómica particular de *A. glandulifera* y caracterizar marcadores que permitan identificar los pares cromosómicos.

Materiales y Métodos

Preparados cromosómicos. Se colectaron las puntas de raíces de plantas obtenidas a partir de las semillas de la accesión KGSSc 30091. Las mismas fueron pretratadas con 2mM 8- hidroxiquinolona (Fernandez and Krapovickas, 1994), fijadas y posteriormente maceradas en una solución de celulasa/pectinasa según Schwarzacher *et al.* (1980).

Los loci para las secuencias repetidas 45S y 5S rDNA fueron localizados usando como sonda: A18S y A25S, dos fragmentos de 1573 y 3296pb, respectivamente, correspondientes a las secuencias de los rRNA 18S y 25S de *A. hypogaea fastigiata*; y A5S, un fragmento de ~400pb correspondiente a una unidad repetida del gen 5S rDNA de *A. hypogaea fastigiata*, incluyendo el espaciador intergénico adyacente.

El pretratamiento de los preparados, la desnaturalización de las sondas, las condiciones de hibridación y lavado post-hibridación, bloqueo y detección indirecta por anticuerpos conjugados con fluorocromos fue realizado de acuerdo al protocolo citado por Seijo *et al.* (2004).

Análisis cariotípico. Se analizaron cinco metafases por medio del programa MicroMeasure 3.3. Los cromosomas se clasificaron de acuerdo a su índice centromérico según Levan *et al.* (1964).

Resultados

De acuerdo a la clasificación de los cromosomas según su índice centromérico la fórmula cariotípica observada fue 8 m + 4 sm + 8 st. La longitud promedio de cada par cromosómico varió entre 3,56 a 5,15 μm y la longitud del cariotipo haploide fue $41,26 \pm 4,83 \mu\text{m}$. Los índices de asimetría A1 y A2 de Romero Zarco (1986) muestran que el cariotipo de esta especie presenta asimetría intracromosómica moderada (A1=0,51), pero asimetría intercromosómica baja (A2=0,10).

El par número dos (cromosoma SAT) presentó un gran satélite en el brazo largo y una constricción secundaria paracentromérica extendida. Ocho pares cromosómicos presentaron bandas heterocromáticas DAPI+. Las mismas fueron principalmente pericentroméricas y variaron en intensidad y tamaño. Los cromosomas subtelocéntricos se

caracterizaron por presentar grandes bloques heterocromáticos que alcanzaron hasta el 26% de la longitud del cromosoma (LT) (par 8). El resto de los cromosomas con bandas presentaron bloques pequeños y tenues que correspondieron a menos del 6,5% de la LT, salvo el cromosoma SAT que presentó una banda de mediano tamaño. El par siete se caracterizó por poseer dos bloques heterocromáticos uno pericentromérico y otro intersticial, mientras que el par cinco solo presentó una banda intersticial. Por medio de la sonda para los genes ARNr 18 y 25S se revelaron siete sitios de hibridación. Dos sitios paracentroméricos activos en los brazos largos del par cromosómico 2. Los pares 9 y 10 subtelocéntricos presentaron sitios de hibridación intersticial de gran intensidad sobre los brazos largos. Mientras que el par seis es heteromórfico, con un solo cromosoma del par con una señal intersticial tenue. El par cinco posee el único sitio de hibridación observado para el rADN 5S, en posición subtelocéntrica sobre el brazo largo.

Discusión

El análisis citológico de la accesión KGSSc 30091 de *A. glandulifera* confirmó el número cromosómico $2n=2x=20$ ya descrito para la especie. La fórmula cariotípica $8m + 4sm + 8st$, si bien presenta diferencias con las ya publicadas para otras accesiones, se asemeja a la propuesta por Fernandez y Krapovickas (1994) de $8m + 12st$. Las diferencias en el índice centromérico de los pares submetacéntricos aquí publicados, probablemente estén relacionados con las alteraciones morfológicas que pueden ocurrir por acción de la proteinasa en el pretratamiento para FISH.

Al igual que el resto de las especies de la sección, el cariotipo de *A. glandulifera* presenta poca diferencia en la longitud entre sus cromosomas no homólogos (genoma unimodal); sin embargo, el grado de asimetría intracromosómica (debido a de los cromosomas subtelocéntricos) es un rasgo exclusivo que lo diferencia de los cariotipos simétricos de las especies con genomas A y B. Otra característica propia de este genoma es la presencia de grandes bloques heterocromáticos pericentroméricos e intersticiales en los cromosomas subtelocéntricos; los cuales contrastan con las bandas muy tenues de algunos los cromosomas metacéntricos. Así, el patrón de bandas de hibridación de los loci ribosomales y las diferencias en la distribución de los bloques heterocromáticos permite identificar cada uno de los pares cromosómicos de acuerdo a una combinación de marcadores particulares a cada par.

Conclusiones

A. glandulifera posee un cariotipo particular por lo que se justifica su asignación a un tipo genómico exclusivo (genoma D).

El mapeo de los loci ribosomales en combinación patrón de bandas heterocromáticas permite identificar todos los pares cromosómicos del complemento.

Se establece un cariotipo de referencia para la localización de nuevos marcadores cromosómicos.

Bibliografía

- Fernández, A. y A. Krapovickas. 1994. Cromosomas y evolución en *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*. 8: 187-220.
- Levan, A., K. Fredga, and A.A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Romero Zarco, C. 1986. A new method for estimating caryotype asymmetry. *Taxon* 35: 526-530.
- Schwarzacher, T., P. Ambros, and D. Schweizer. 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Systematics and Evolution* 134: 293-297.
- Seijo, J.G., G.I. Lavia, A. Fernández, A. Krapovickas, D. Ducasse and E.A. Moscone. 2004. Physical mapping of 5S and 18S-25S rRNA genes evidences that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid species involved in the origin of *A. hypogaea* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 91: 2293-2303.
- Stalker, H.T. 1991. A new species in section *Arachis* of peanuts with a D genome. *American Journal of Botany*. 78: 630-637.