

Prov. + 13/71

T
12
100

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE GENETICA**



**Análisis molecular de los
cromosomas A y B de
*Crepis capillaris***

BIBLIOTECA	UNIVERSITARIA
GRANADA	
Nº Documento	619661058
Nº Copia	2/208621

**MANUEL JAMILENA QUESADA
GRANADA, 1992**

**ANALISIS MOLECULAR DE LOS CROMOSOMAS
A Y B DE *Crepis capillaris***

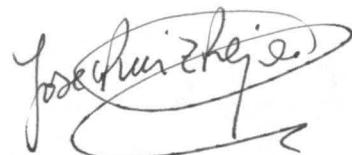
Trabajo que presenta D. MANUEL JAMILENA QUESADA
para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

DEPARTAMENTO DE GENETICA

Vº Bº Directores de Tesis



Prof. Dr. Manuel Ruiz Rejón



Prof. Dr. Carmelo Ruiz Rejón

UNIVERSIDAD DE GRANADA

3 NOV. 1992

COMISION DE DOCTORADO



A Merce
A mi hijo Alvaro

AGRADECIMIENTOS

Varias han sido las personas que de un modo u otro han colaborado en el desarrollo del presente trabajo, y a las cuales quiero expresar mi más profundo agradecimiento.

En especial, a los Drs. Manuel Ruiz Rejón y Carmelo Ruiz Rejón por su inmejorable labor como directores de esta Tesis y por la amistad y confianza que han depositado en mí.

A mi mujer, Merce por su constante apoyo moral. Sin ti, este trabajo nunca hubiese llegado a su fin.

Al Dr. José Oliver, a quien debo el análisis de las secuencias que se ha llevado a cabo en esta Tesis, así como las muchas sugerencias que me ha dado durante el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. José Miguel Martínez Zapater por iniciarme en las técnicas de análisis molecular y por sus constantes sugerencias para la resolución de todos los problemas que han surgido en este trabajo.

A la Dra. Esther Ferrer y al Dr. Gregorio Hueros de la Universidad de Alcalá de Henares, quienes me iniciaron en las técnicas de clonación de ADN repetido.

Al Dr. Rafael Lozano Ruíz quien se ha preocupado constantemente por mi trabajo y me ofreció su ayuda siempre que lo necesité. Gracias también por los muchos ratos frente al ordenador.

Al Dr. R.N. Jones (University College of Wales) quien, además de proporcionarnos las semillas de todo el material de *Crepis capillaris* analizado en esta Tesis, ha leído y criticado muchos de los resultados que sobre la estructura molecular de los cromosomas Bs se tratan en esta Tesis.

A los Dres. R. Appels (CSIRO Division of Plant Industry, Canberra), J.S. Heslop-Harrison (JI Centre for Plant Science Research, Norwich) y J.S Parker (University of Reading) por sus sugerencias para esclarecer algunos aspectos del presente trabajo.

Al Dr. J. Grau (Universidad de Munich) y al Jardín Botánico de Kew, que amablemente nos cedieron el material de las distintas especies de *Crepis* utilizadas en este estudio.

A los Dres. M. Clark (Queen Mary and Westelfield College, London), T.H.N. Ellis (John Innes Institute, Norwich) y E. Richards (Cold Spring Harbor Laboratory, New York) quienes nos proporcionaron los clones de ADN_r, ADN 5S y ADN telomérico que hemos utilizado como sondas.

A Manolo Garrido, amigo y compañero de fatigas en estos últimos años. Gracias por hacer que todas esas tantas horas de laboratorio fueran más llevaderas, y como no por las muchas charlas, científicas o no, que hemos tenido frente a una taza de café.

A la Dra. M. Nieves Rodríguez y a Rosalía Arrebola por su asistencia técnica en la secuenciación de ADN.

ABREVIATURAS

ADNr	ADN ribosómico 18S, 5.8S y 25S
AT	Adenina + Timina
DAPI	4-6-diamino-2-fenilindol-2ClH
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
F-PERT	<i>Formamide-phenol emulsion reassociation technique</i>
GC	Guanina + Citosina
IGS	<i>Intergenic spacer</i>
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactosido
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
Kb	Kilobase
ng	nanogramo
NOR	Región organizadora del nucleolo
pb	par de bases
pg	picogramo
SDS	sodio dodecil sulfato
Tris	Trihidroximetilaminometano
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactosido
μl	microlitro
μg	microgramo
μm	micrometro

INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
1.1. El ADN repetido.....	1
1.1.1. El ADN repetido en tándem.....	4
1.1.1.1. El ADN satélite.....	4
A) Variaciones entre las unidades de un ADN satélite.....	5
B) Homologías internas dentro de la unidad de repetición....	7
C) Homologías y diferencias entre distintos ADNs satélites..	8
D) Localización y distribución del ADN satélite.....	9
1.1.1.2. El ADN ribosómico 18S, 5.8S y 25S (ADNr).....	12
1.1.1.3. El ADN 5S.....	15
1.1.1.4. El ADN telomérico.....	16
1.1.2. Evolución y función del ADN repetido.....	18
1.2. Los cromosomas Bs.....	20
1.2.1. El ADN de los cromosomas Bs.....	21
1.2.2. Origen y evolución de los cromosomas Bs.....	25
1.2.3. Los cromosomas Bs de <i>C. capillaris</i>	27
2. OBJETIVOS.....	30
3. MATERIAL Y METODOS.....	32
3.1. Material vegetal.....	32
3.2. Preparación de ADN celular de plantas.....	33
3.3. Técnica de reasociación de ADN genómico en una emulsión de fenol y formamida (F-PERT).....	34
3.4. Identificación, aislamiento y clonación de ADN altamente repetido.....	35
3.4.1. Identificación y aislamiento de ADN altamente repetido.....	35
3.4.2. Clonación del ADN repetido aislado de geles de agarosa..	36
3.4.3. Detección de los clones recombinantes con el fragmento de ADN repetido de interés.....	37

3.5. Análisis de secuencias de ADN repetido mediante hibridación en Southern-blot.....	38
3.5.1. Restricción de ADN genómico, electroforesis y transferencia a membrana.....	38
3.5.2. Plásmidos utilizados.....	39
3.5.3. Purificación de plásmidos y de fragmentos de restricción utilizados como sondas.....	40
3.5.4. Marcaje de las sondas e hibridación.....	41
3.6. Estimación del número de copias de las familias de ADN repetido Eco RI, Dra I y Hind III en el genoma de <i>C. capillaris</i>	42
3.7. Secuenciación y análisis de las secuencias.....	43
3.8. Técnicas citogenéticas.....	44
3.8.1. Análisis del cariotipo.....	44
3.8.2. Obtención de preparaciones cromosómicas. Técnica de Bando C.....	44
3.8.3. Hibridación <i>in situ</i>	45
A) Marcaje de las sondas.....	45
B) Hibridación.....	45
C) Lavado de las preparaciones y detección de los sitios de hibridación.....	47
4. RESULTADOS.....	50
4.1. Experiencias para detectar ADN específico de los cromosomas Bs de <i>C. capillaris</i>	50
4.1.1. Análisis del ADN repetido de plantas con y sin cromosomas Bs.....	51
4.1.2. Hibridación sustractiva entre ADN de plantas con y sin cromosomas Bs mediante la técnica F-PERT.....	52
4.2. Análisis de secuencias de ADN altamente repetido en el genoma estándar y en los cromosomas Bs de <i>C. capillaris</i>	55
4.2.1. La familia Eco RI.....	55
A) Identificación, aislamiento y clonación.....	55
B) Secuencia de nucleótidos.....	56

C) Determinación del número de copias y de su organización genómica.....	56
D) Hibridación <i>in situ</i>	58
4.2.2. La familia Dra I.....	59
A) Identificación, aislamiento y clonación.....	59
B) Secuencia de nucleótidos.....	59
C) Determinación del número de copias y de su organización genómica.....	59
D) Hibridación <i>in situ</i>	61
4.2.3. Posición relativa de las familias Eco RI y Dra I en los cromosomas y núcleos mitóticos y meióticos de <i>C. capillaris</i>	61
4.2.4. La familia Hind III.....	62
A) Identificación, aislamiento y clonación.....	62
B) Secuencia de nucleótidos.....	62
C) Determinación del número de copias y de su organización genómica.....	63
D) Hibridación <i>in situ</i>	64
4.2.5. Distribución de las familias Eco RI, Dra I y Hind III en el genoma de otras especies del género <i>Crepis</i>	64
4.3. Análisis del ADN de los cromosomas Bs de <i>C. capillaris</i> mediante hibridación <i>in situ</i> con ADN genómico (GISH).....	65
4.4. Análisis del ADN ribosómico en el genoma estándar y en los cromosomas Bs de <i>C. capillaris</i>	66
4.4.1. Hibridación <i>in situ</i>	66
A) El ADN ribosómico 18S, 5.8S y 25S.....	66
B) El ADN 5S.....	67
4.4.2. Caracterización molecular.....	68
A) El ADN ribosómico 18S, 5.8S y 25S.....	68
B) Comparación entre el ADN ribosómico 18S y 25S en el genoma estándar y en los cromosomas Bs.....	71
C) El ADNr en otras especies de <i>Crepis</i>	72
D) El ADN ribosómico 5S.....	72

4.5. El ADN telomérico en los cromosomas A y B de <i>C. capillaris</i>	74
4.6. Figuras.....	77
5. DISCUSION.....	98
5.1. El ADN satélite de <i>C. capillaris</i>	98
5.1.1. Secuencia de nucleótidos de los ADNs satélites de <i>C. capillaris</i>	98
A) Subrepeticiones internas dentro de la unidad de repetición del satélite.....	99
B) Grado de conservación del ADN satélite entre distintas especies.....	100
5.1.2. Organización genómica.....	102
A) Las familias Eco RI y Dra I.....	102
B) La familia Hind III.....	103
5.1.3. Distribución cromosómica del ADN satélite.....	106
5.1.4. Disposición del ADN satélite en los núcleos interfásicos.....	110
5.2. El ADN ribosómico de <i>C. capillaris</i>	112
5.2.1. El ADN ribosómico 18S, 5.8S y 25S.....	112
5.2.2. El ADN ribosómico 5S.....	118
5.3. Análisis comparativo del ADN de los cromosomas A y B: origen y evolución de los cromosomas Bs de <i>C. capillaris</i>	120
6. CONCLUSIONES.....	132
7. BIBLIOGRAFIA.....	137

1

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

1.1. EL ADN REPETIDO.

Los genomas eucarióticos, y en especial los de plantas superiores, se caracterizan por su gran contenido en ADN, así como por una gran variación en la cantidad de ADN entre diferentes especies. En el caso de plantas esta variación oscila entre los aproximadamente 70.000 Kb por genoma de *Arabidopsis thaliana*, hasta los aproximadamente 100 millones de Kb encontrados en distintas especies de *Fritillaria* (Liliaceae) (Bennett y Smith, 1991). Esta variación se extiende, en ocasiones, a las especies del mismo género, tal como ocurre en el género *Crepis* donde se han detectado variaciones en el contenido de ADN de hasta 10 órdenes de magnitud (Jones y Brown, 1976). Teniendo en cuenta que la complejidad estructural y evolutiva de las especies con menor contenido en ADN es similar a aquellas con mayor contenido (especialmente cuando pertenecen al mismo género), es fácil concluir que las plantas superiores poseen un exceso considerable de ADN respecto al que necesitan para determinar su complejidad biológica (Flavell, 1982a; Smyth, 1991).

Los estudios de desnaturalización y renaturalización llevados a cabo en el genoma eucariótico a mediados de los sesenta pusieron de manifiesto que una proporción importante del genoma eucariótico está formada por secuencias de ADN repetido (Britten y Kohne, 1968). Pronto se pensó que el ADN repetido podría ser el responsable de las variaciones en el contenido de ADN entre diferentes especies de plantas, así como del alto contenido de ADN por genoma presente en éstas. De hecho, tras determinar la proporción de ADN repetido y ADN de secuencia única en muchas especies (Flavell, 1982a), se observó que plantas con genomas pequeños poseen menor proporción de secuencias repetidas que aquellas que presentan mayor contenido en ADN. Así, *Arabidopsis thaliana* con un pequeño genoma posee aproximadamente un 15% de secuencias repetidas (Leutwiler *et al.*, 1984) mientras que en

las especies de cereales, que poseen genomas con alto contenido en ADN, el ADN repetido constituye un 75-90% del genoma (Flavell, 1980). Por tanto, la variación en el contenido de ADN entre distintas especies está causada principalmente por variaciones en el contenido de ADN repetido (Flavell, 1982a)

A la vista de las cinéticas de renaturalización, Britten y Davidson (1971) distinguen dos tipos fundamentales de ADN repetido. El primero o ADN altamente repetido lo constituyen secuencias que están presentes en miles de millones de copias en el genoma. Se trata de pequeñas secuencias organizadas en tándem las cuales, en la mayoría de los casos, pueden separarse del resto del ADN mediante ultracentrifugación en gradientes de densidad como ADN satélite. El segundo grupo o ADN medianamente repetido, lo constituyen una variedad de secuencias más complejas que se repiten desde una docena hasta miles de copias, y que suelen estar dispersas por todo el genoma.

Aunque esta terminología sigue manteniéndose en la actualidad, sin embargo, se conoce la existencia de secuencias que aún estando dispersas constituyen la fracción más repetida de un genoma y otras que, aún organizadas en tándem, son secuencias complejas que pueden llegar a transcribirse (Doolittle, 1985). De igual forma, la distinción entre ADN de secuencia única y ADN repetido de bajo y alto número de copias no es tan exacta. De hecho, aunque las unidades de una misma familia de ADN repetido mantienen una relación en su secuencia, ésta no es idéntica. Esto hace que la cantidad de secuencias únicas y repetidas que encontramos en un determinado genoma varíe en función de las condiciones de astringencia en las que se realiza la renaturalización (Flavell, 1982a). El genoma eucariótico muestra, pues, un espectro continuo en el número de secuencias así como en la homología que existe entre ellas. Por ello, algunos autores (Singer y Berg, 1991) distinguen entre secuencias repetidas organizadas en tándem y secuencias dispersas en distintos lugares del genoma junto a ADN de copia única, ya que es posible que los

mecanismos que originan y mantienen estos dos tipos de elementos repetidos sean muy diferentes.

Dentro del primer grupo de ADN's repetidos se encuentran, entre otros, el ADN satélite, los genes que codifican para algunos ARNs (el ARN ribosómico 18S, 5.8S y 25S, el ARN ribosómico 5S y el ARN de transferencia), las familias multigénicas que codifican para proteínas tales como las histonas, y el ADN que forma parte de los telómeros de los cromosomas eucarióticos. El segundo grupo o ADN repetido disperso está formado por secuencias como las SINES y las LINES de mamíferos (Singer, 1982) o la familia *Cin1* de maíz (Shepherd *et al.*, 1984). La estructura y organización de las secuencias repetidas dispersas es mucho más compleja y variable que las que muestran las secuencias repetidas en tándem. Muchos de los elementos repetidos dispersos estudiados muestran características similares a la de los elementos transponibles (Jagadeeswaran *et al.*, 1981; Shepherd *et al.*, 1984; Soares *et al.*, 1985; Smyth *et al.*, 1989), por lo que se cree que la transposición es un mecanismo capaz de amplificar y distribuir este tipo de elementos repetidos por todo el genoma (Smyth, 1991).

Dispersos por el genoma eucariótico existen también pequeños clusters de secuencias simples de ADN en tándem: los "minisatélites" y los "microsatélites". Los minisatélites están formados por unidades repetidas de aproximadamente 15-35 pb. Aunque, se han aislado y caracterizado principalmente a partir del genoma humano y de otros mamíferos (Jeffreys *et al.*, 1985), repeticiones similares se han encontrado también en aves (Gyllensten *et al.*, 1989) y en plantas (Martienssen y Baulcombe, 1989). Los microsatélites están formados por unidades simples de di-, tri- o tetranucleótidos repetidas en tándem en varios sitios del genoma eucariótico (Tautz, 1984; Weising *et al.*, 1992). Una característica común de este tipo de ADN repetido es su gran variabilidad en el número de copias repetidas presentes en cada uno de los clusters dispersos por el genoma. Esto hace que cualquier sonda capaz de detectar estos loci polimórficos origine un patrón de

hibridación en Southern-blot específico de cada individuo (DNA fingerprint) (Jeffreys, 1987). En este trabajo, nos vamos a centrar en el ADN repetido en tándem.

1.1.1. EL ADN REPETIDO EN TANDEM

1.1.1.1. EL ADN SATELITE

El ADN satélite está formado por secuencias simples de ADN que se repiten millones de veces en tándem formando grandes clusters en los cromosomas eucarióticos. Esta característica permite separarlas del resto del genoma como una banda "satélite" mediante ultracentrifugación en gradientes de densidad.

Desde el descubrimiento del ADN satélite (Kit, 1961; Sueoka, 1961), la centrifugación en gradiente de densidad fué el primer método empleado para aislar secuencias altamente repetidas en tándem. No obstante, y aunque dicha técnica permite incluso separar diferentes satélites relacionados en secuencia (Gall y Atherton, 1974), en muchos casos las bandas de ADN satélite que aparecen como picos homogéneos en la ultracentrifugación poseen más de una familia de secuencias o incluso puede tratarse de ADN cloroplastidial o mitocondrial, los cuales bandean con una densidad diferente del ADN nuclear (Flavell, 1982a).

El descubrimiento de las enzimas de restricción y el desarrollo de las técnicas moleculares de clonación han permitido manipular y analizar de forma más precisa el complejo genoma eucariótico y concretamente el ADN satélite. Así, cuando se corta el ADN genómico con enzimas de restricción, se fracciona por electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida y se tiñe con bromuro de etidio, las secuencias de ADN repetido aparecen como bandas discretas en el gel. Esto ha permitido identificar, aislar y clonar secuencias específicas de ADN repetido y especialmente de ADN satélite (Kato *et al.*, 1984;

Martínez Zapater *et al.*, 1986; Batistoni *et al.*, 1991). De igual forma, la digestión con enzimas de restricción del ADN satélite previamente aislado por ultracentrifugación, permite purificar y clonar secuencias específicas de la familia o familias de ADN repetido que forman parte del mismo (Peacock *et al.*, 1981; John *et al.*, 1986; Jantsch *et al.*, 1990).

A) Variaciones entre las unidades de un ADN satélite.

Aunque las secuencias que forman parte de un ADN satélite son similares no son en ningún caso idénticas. Evidencias que demuestran esta heterogeneidad son: a) la renaturalización de un determinado ADN satélite conlleva una disminución en la estabilidad térmica del ADN renaturalizado, lo que da idea del número de apareamientos incorrectos que se producen al renaturalizar dos elementos diferentes de una misma familia (Bedbrook *et al.*, 1980; Flavell, 1982a; Barnes *et al.*, 1985), y b) las unidades de un mismo satélite no poseen todas las mismas dianas de restricción (Brutlag, 1980; Singer, 1982). La digestión de un ADN satélite con enzimas de restricción origina normalmente un patrón en escalera, el cual refleja las variaciones en las dianas de restricción entre las diferentes copias. Estas variaciones pueden ser de distribución aleatoria o, por el contrario, reflejar alteraciones locales de copias vecinas, las cuales forman grandes clusters en ciertas regiones cromosómicas o se distribuyen en intervalos regulares dentro del satélite (Singer, 1982).

Las alteraciones puntuales pueden suponer tanto la pérdida como la ganancia de la secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción. En el primer caso, y si la alteración es aleatoria, aparece lo que se ha venido a llamar un patrón de digestión tipo A, en el que la mayor proporción de fragmentos corresponden a la longitud del monómero, mientras que la proporción de multímeros de mayor peso molecular va disminuyendo progresivamente. En el segundo caso, sin embargo, aparece una predominancia de fragmentos de ADN de alto peso

molecular (patrón de digestión tipo B; Hörz y Zachau, 1977). Alteraciones puntuales al azar en la secuencia de los monómeros que puedan alterar sitios de restricción específicos, se han encontrado en multitud de ADNs satélites de plantas (Kato *et al.*, 1984; Martínez Zapater *et al.*, 1986; Leclerc y Siegel, 1987; Kochko *et al.*, 1991; Solano *et al.*, 1992). En ciertos casos dichas variaciones han podido ser comprobadas directamente tras la secuenciación de varios miembros de una familia de ADN repetido (Grellet *et al.*, 1986; Martínez-Zapater *et al.*, 1986; Sibson *et al.*, 1991).

En algunos casos estas alteraciones no son al azar sino que se localizan en ciertas regiones concretas del satélite, ya sea debido a una amplificación selectiva de ciertas regiones del satélite o a la acumulación de diferentes mutaciones en diferentes sitios cromosómicos (Brutlag, 1980). Uno de los satélites más estudiados en este sentido es el satélite alfa humano. Dicho ADN satélite está formado por monómeros de aproximadamente 171 pb que se repiten en tándem en las bandas-C centrómericas de todos los cromosomas (Manuelidis, 1978). No obstante, sobre esta organización en tándem del monómero, cada cromosoma muestra una periodicidad diferente para sitios de restricción, es decir, existe una unidad de repetición de mayor tamaño (formada por multicopias del monómero) específica para cada cromosoma (Willard y Waye, 1987a y b).

Alteraciones agrupadas en cluster han sido encontradas también en el ADN satélite de plantas. Así, en aquellos casos en donde se han clonado ordenaciones en tándem de varios elementos de ADN repetido, se ha podido comprobar que, en general, la divergencia que existe entre unidades próximas es menor que la que existe entre unidades más separadas (Grellet *et al.*, 1986; Sibson *et al.*, 1991). Unidades repetidas de mayor tamaño que las del monómero (al igual que ocurre con el ADN satélite alfa humano) se han encontrado recientemente en plantas donde Kochko *et al.* (1991) observaron que aunque en ciertas variedades de *Oryza rufipogon* cierto ADN satélite se organiza en

unidades de 360 pb, en otras este mismo satélite aparece organizado en unidades de mayor orden, las cuales se corresponden con la unión de 10, 15 o 16 monómeros de 360 pb. Dichos autores sugieren que la divergencia en la secuencia de las unidades del satélite seguida de amplificaciones que afectan a unidades de mayor tamaño que el monómero dan lugar a este tipo de organización.

Además de por alteraciones puntuales, las unidades de un satélite pueden variar como consecuencia de largas inserciones o deleciones. Así, Bedbrook *et al.* (1980) demostraron que las variaciones que aparecen en el ADN satélite de *Secale cereale* definido por unidades de 180 pb se deben a la inserción de una secuencia diferente dentro del satélite, y a la posterior amplificación de una unidad de mayor longitud formada por varias unidades del satélite y de la secuencia insertada.

La homología entre las distintas unidades de un ADN satélite varía de unos satélites a otros e incluso entre distintas familias de ADN satélite de una misma especie (Bedbrook *et al.*, 1980). Esto puede reflejar el tiempo de divergencia entre las distintas familias desde que se originaron o los distintos grados de conservación y homogeneización entre diferentes familias de ADN repetido (Flavell, 1982a). Por otro lado, ciertos miembros de una misma familia sufren, a menudo, reamplificaciones durante la evolución lo que impide un análisis exhaustivo de la tasa de acumulación de mutaciones en el ADN repetido (Flavell, 1982a).

B) Homologías internas dentro de la unidad de repetición.

El análisis de la secuencia de muchos ADNs satélites animales ha puesto de manifiesto la presencia de homologías internas dentro de la unidad de repetición básica (Brutlag, 1980; Singer, 1982). En este sentido, la unidad básica de 234 pb en la que se organiza el ADN satélite presente en las regiones de heterocromatina paracentromérica

del ratón *Mus musculus* puede dividirse en cuatro subunidades de 58-60 pb que muestran entre sí una homología del 60%. A su vez, cada subunidad está formada por subrepeticiones de menor tamaño las cuales muestran un mayor grado de divergencia en su secuencia. A la vista de estos resultados, se ha sugerido que este satélite puede haberse originado como consecuencia de mutaciones y amplificaciones alternantes que comenzaron con 3 secuencias relacionadas de unos 9 nucleótidos (Singer, 1982).

Ciertos ADN satélites de plantas muestran también homologías internas dentro de la unidad básica de repetición. Grellet *et al.* (1986), tras examinar la secuencia presente en la unidad de 177 pb en la que se organiza el ADN satélite de *Raphanus sativus*, observaron que ésta puede dividirse en tres bloques más pequeños de aproximadamente 60 pb, los cuales mantienen una homología del 60%. Los autores proponen que la duplicación y divergencia de la secuencia de 60 pb ha dado lugar a la unidad mayor de 177 pb, la cual ha sido posteriormente amplificada. De igual forma, Sibson *et al.* (1991) observaron que las unidades de repetición de 176-177 pb que definen el ADN satélite de dos especies de *Brasica* (*B. napus* y *B. campestris*) están formadas por tres subunidades de 59 pb, las cuales han sufrido pequeñas inversiones y duplicaciones unas respecto de otras a lo largo de la evolución. Las unidades básicas de repetición de otros ADNs satélites, sin embargo, no muestran homologías internas (Barnes *et al.*, 1985; Martínez-Zapater *et al.*, 1986). Brutlag (1980) ha sugerido que estos satélites más complejos, que no parecen tener su origen en la amplificación de repeticiones de menor tamaño, pueden ser más antiguos que aquellos con subrepeticiones, o tener una función diferente.

C) Homologías y diferencias entre distintos ADNs satélites.

La mayor parte de los ADNs satélites estudiados, tanto en animales como en plantas, son específicos de una sola especie o de un grupo de especies muy relacionadas (Singer, 1982; Lapitan, 1992). Así,

por ejemplo, los ADNs satélites aislados de centeno (Appels *et al.*, 1978), cebada (Belototsky y Ananiev, 1990) o trigo (Gerlach *et al.*, 1978) son específicos de cada especie. De igual forma, el satélite TGRI de tomate, aunque presente en todas las especies del género *Lycopersicon*, no se ha encontrado en otras especies relacionadas del género *Solanum* (Ganal *et al.*, 1988). Por tanto, el ADN satélite se puede considerar como una de las regiones del genoma eucariótico que más cambian a lo largo de la evolución (Singer, 1982).

En otros casos, la comparación de la secuencia de varios ADNs satélites, tanto de animales como de plantas, ha puesto de manifiesto la existencia de regiones que comparten una gran homología (Brutlag, 1980; Grellet *et al.*, 1986; Martínez-Zapater, 1986). Estas similitudes entre distintos ADN satélites podría indicar que el ADN satélite mantiene una determinada función, o que los distintos ADNs satélites se han originado a partir de secuencias conservadas que se han amplificado independientemente en cada especie (Martínez-Zapater *et al.*, 1986).

La heterogeneidad en la secuencias de los ADNs satélites, se extiende también a los distintos ADNs satélites de una especie. Así, diferentes ADNs satélites en los géneros *Brasica* (Hallden *et al.*, 1987; Gupta *et al.*, 1990) o *Beta* (Schmidt *et al.*, 1991) no mantienen ninguna homología en su secuencia. En cambio, los ADNs satélites encontrados en *Cucumis sativus* (Ganal *et al.*, 1986; Ganal y Hemleben, 1988) parecen tener un origen común, al igual que ocurre con las secuencias simples de ADN satélite de *Drosophila melanogaster* las cuales, dada su estrecha relación en secuencia y su proximidad física, podrían haber derivado unas de otras (Lohe y Roberts, 1988).

D) Localización y distribución del ADN satélite.

Desde que se descubriera que el ADN satélite del ratón formaba parte de las regiones de heterocromatina constitutiva (Pardue y Gall,

1970), muchos estudios de hibridación "in situ" utilizando como sonda el ADN satélite aislado en gradientes de densidad o secuencias ya clonadas de ADN repetido han demostrado que la heterocromatina constitutiva es el sitio principal donde se localiza el ADN altamente repetido (John, 1988). En aquellas especies donde coexisten más de un ADN satélite, éstos pueden tener dos patrones diferentes de distribución. En ciertos casos, varios ADN satélites se localizan en las mismas bandas C de un cariotipo. Así, en *Secale cereale* se han aislado seis familias diferentes de ADN repetido en tándem las cuales se localizan juntas en todas las bandas C teloméricas (Appels y McIntyre, 1985). La heterocromatina paracentromérica de *Drosophila melanogaster* está también formada por varios ADNs satélites (Lohe y Roberts, 1988).

En otros casos, sin embargo, los diferentes ADNs satélites se localizan en distintas bandas C. Estas diferencias en la composición de la heterocromatina pueden estar relacionadas con su localización cromosómica tal y como ha señalado John (1988). Así, en algunas especies tales como cetáceos (Arnason *et al.*, 1978) o en *Atractomorpha similis* (John *et al.*, 1986), la composición en ADN repetido de las bandas C centroméricas o paracentroméricas es diferente de la que muestran las bandas C terminales o intersticiales. No obstante, en otros casos se ha observado que las bandas C centroméricas de distintos cromosomas pueden estar formadas por varias familias de ADN repetido. Así, en *Sus scrofa*, el ADN repetido presente en la heterocromatina centromérica de los cromosomas acrocéntricos difiere del que presentan estas mismas regiones en los cromosomas metacéntricos (Jantsch *et al.*, 1990).

Se sabe además que la heterocromatina constitutiva tiende a acumularse en ciertas regiones tales como los telómeros y los centrómeros. El análisis de la distribución de la heterocromatina en muchas especies animales y vegetales ha puesto de manifiesto que las bandas C de cromosomas no homólogos tienden a estar localizadas en

sitios similares o equilocales respecto al centrómero (Heitz, 1935). Por tanto, deben existir ciertos mecanismos capaces de originar secuencias de ADN repetido en sitios similares del genoma.

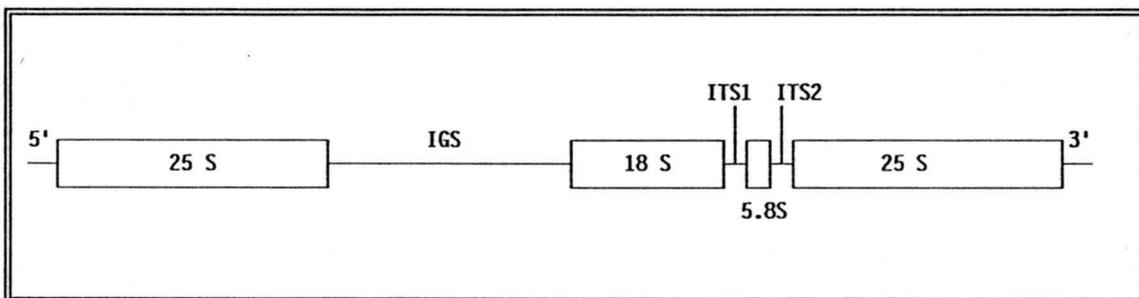
En un intento de explicar esta distribución particular de la heterocromatina así como las diferencias en la composición entre distintas bandas C de un mismo complemento, Schweizer y Loidl (1987) han propuesto un modelo general de evolución de la heterocromatina basado en la disposición espacial de los cromosomas en los núcleos interfásicos. Para explicar la distribución equilocal de la heterocromatina, estos autores proponen que las regiones teloméricas y centroméricas funcionan como sitios donde se lleva a cabo la amplificación y posterior distribución de secuencias repetidas a sitios equilocales de cromosomas no homólogos. Esta distribución se vería facilitada por una disposición espacial de los cromosomas en los núcleos interfásicos (polarización "Rabl"; Rabl, 1885) que permite que las regiones equilocales de cromosomas no homólogos se mantengan lo suficientemente próximas como para poder intercambiar secuencias de ADN heterocromático.

En otros casos, una familia de ADN repetido se localiza específicamente en un cromosoma concreto del complemento. Aunque esta distribución específica se ha descrito principalmente en el caso de cromosomas sexuales (Cooke, 1976), sin embargo, Schweizer y Loidl (1987) han propuesto que la heterocromatina de los cromosomas NORs puede también diferir de la del resto de los cromosomas del cariotipo. No obstante, son pocos los datos moleculares que apoyan esta hipótesis. Barnes *et al.*, (1985) observaron que el ADN satélite que se localiza en todas las bandas C teloméricas del complemento de *Allium cepa*, no hibrida con la heterocromatina terminal del cromosoma NOR. En la especie humana, existe una subfamilia de ADN satélite alfa y una familia de ADN disperso (familia 724) que, aunque están localizadas preferentemente en los cromosomas NORs, están también presentes en otros cromosomas (Kurnit *et al.* 1986; Jorgensen *et al.* 1987).

1.1.1.2. EL ADN RIBOSOMICO 18S, 5.8S y 25S (ADNr)

Los genes que codifican para los ARNs ribosómicos citoplasmáticos 18S, 5.8S y 25S constituyen una de las familias de secuencias repetidas más conservadas en eucariotas. Estos se organizan formando uno o varios clusters de unidades repetidas en tándem, cada una de las cuales contiene un gen estructural para cada uno de los ARNs ribosómicos. En la mayor parte de los casos, estos clusters de ADNr coinciden con las regiones organizadoras del nucleolo o NORs.

La unidad básica de repetición del ADNr es muy similar entre las distintas especies de eucariotas (Hemleben *et al.*, 1986). Del extremo 5' al extremo 3', los genes de ADNr se disponen de la forma 18S + 5.8S + 25S. Entre el extremo 3' del gen 25S y el extremo 5' del gen 18S se localiza un ADN espaciador (espaciador intergénico, IGS) cuya longitud varía desde 1 Kb hasta 12 Kb en el caso de plantas (Rogers y Bendich, 1987). Básicamente, cada unidad está formada por una región que no se transcribe y que constituye la mayor parte del IGS y una unidad de transcripción formada por una pequeña región del IGS y por la región que codifica para los ARNs ribosómicos 18S, 5.8S y 25S. Separando los genes 18S, 5.8S y 25S, existen dos regiones internas que sí se transcriben (ITS1 y ITS2) (ver esquema adjunto) (Hemleben *et al.*, 1986).



En aquellos casos donde se ha llevado a cabo un estudio detallado del IGS, se ha observado que aproximadamente la mitad del mismo está formado por subrepeticiones cortas en tándem cuya longitud oscila entre 100 pb y 300 pb (Appels y Dvorak, 1982; Yakura *et al.*,

1984; McMullen *et al.*, 1986; Grellet *et al.*, 1989). La función de estos elementos repetidos en el IGS no está aún muy clara. No obstante, los estudios llevados a cabo principalmente en sistemas animales sugieren que estas subrepeticiones pueden regular la transcripción del ADNr al funcionar como sitios de terminación de la transcripción (Labhart y Reeder, 1986), sitios de unión para la ARN polimerasa I o para factores de transcripción (Moos, 1983), o como "enhancers" de la transcripción (Reeder, 1984).

La mayor parte del ARN que existe en una célula es ARN ribosómico. En la mayor parte de los eucariotas, esta gran demanda de ARNr se ve satisfecha por la presencia de un gran número de genes de ADNr. En los genomas animales existen entre 100 y 1000 copias de ADNr mientras que en el genoma de plantas el número de copias oscila entre 500 y 400.000 (Rogers y Bendich, 1987). Pero, el número de copias para el ADNr no sólo varía entre diferentes especies sino que también puede diferir entre individuos de la misma especie e incluso entre células de un mismo individuo. Aunque debe de existir un número mínimo de copias para mantener el metabolismo normal de la célula, el aumento en el número de genes de ADNr no afecta al fenotipo normal del individuo (Rogers y Bendich, 1987). Así, en maíz, se han detectado variaciones en la cantidad de ADNr de hasta cinco órdenes de magnitud, sin que ello afecte a la cantidad de ARNr o proteínas producidas ni al fenotipo general de la planta (Buescher *et al.*, 1984).

Esta variación intraespecífica en la cantidad de ADNr, indica que, en general, el genoma eucariótico y principalmente el de plantas presenta un excesivo número de copias de ADNr con respecto al que se requiere para la síntesis de ARNr. Deben, por tanto, existir ciertos mecanismos capaces de regular la transcripción del ADNr. Algunos autores han propuesto que parte de los genes de ADNr permanecen inactivos ya que se encuentran condensados en forma de heterocromatina (Flavell, 1986b). Esta organización del ADNr está bien estudiada en el caso del maíz, donde se ha demostrado que la heterocromatina que

reside a ambos lados del NOR híbrida con ADN_r y es capaz de organizar un nucleolo cuando el NOR adyacente desaparece (Givens y Phillips, 1976). El resto de genes son capaces de transcribirse cuando permanecen descondensados y constituyen la región organizadora del nucleolo (NOR) (Flavell, 1986b). Esta última fracción de genes permanece sin metilar en ciertos sitios específicos, por lo que se cree que la metilación es otro factor importante a la hora de regular la transcripción del ADN_r (Flavell, 1986b; Hemleben *et al.*, 1986)

La longitud de la unidad básica de repetición del ADN_r difiere de unas especies a otras oscilando entre 7.8 Kb y 18.5 Kb en el caso de plantas (Lapitan, 1992). Esta heterogeneidad se debe principalmente a variaciones en la longitud y en la secuencia del IGS ya que la longitud así como la secuencia de la unidad de transcripción, está muy conservada entre las distintas especies (Long y Dawid, 1980; Rogers y Bendich, 1987). En la mayor parte de las plantas estudiadas existe además una variación intraespecífica para la longitud de las repeticiones de ADN_r la cual está relacionada con variaciones en el número de subrepeticiones existentes en el IGS (Hemleben *et al.*, 1986; Rogers y Bendich, 1987). Esta variación en el número de subunidades dentro del IGS se ha atribuido a la formación de intercambios desiguales entre subunidades repetidas de un mismo cromosoma o entre cromosomas homólogos (Flavell, 1985; Williams y Strobeck, 1985). En algunas plantas tales como el guisante (Ellis *et al.*, 1984) o cebada (Saghai-Maroo *et al.*, 1984), las diferentes clases de ADN_r definidas por su longitud no se encuentran entremezcladas en un mismo cluster de ADN_r sino que cada una de ellas se encuentra localizada en un locus o NOR específico.

1.1.1.3. EL ADN 5S

Los genes nucleares que codifican para el ARN ribosómico 5S (ADN 5S) constituyen, junto con el ADNr, otra de las familias multigénicas conservadas en eucariotas. En la mayor parte de los eucariotas superiores, la organización del ADN 5S es distinta de la que muestra el ADNr. El ADN 5S está formado por unidades repetidas en tándem cuya longitud varía de 200 a 900 pb en las distintas especies analizadas (Lapitan, 1992). Cada unidad de repetición está formada por una región codificante de aproximadamente 120 pb que constituye la región más conservada (Barciszewska *et al.*, 1985; Ellis *et al.*, 1988), y un espaciador intergénico que muestra una gran variación interespecífica tanto en la secuencia como en la longitud (McIntyre *et al.*, 1988b; Ellis *et al.*, 1988; Kolchinsky *et al.*, 1990). Duplicaciones o deleciones dentro del espaciador intergénico son también la causa de variaciones intraespecíficas para la longitud de las unidades repetidas de ADN 5S (Ellis *et al.*, 1988; Kolchinsky *et al.*, 1990). Así, el ADN del guisante está formado por dos tipos de unidades las cuales difieren por la presencia de una duplicación de 50 pb en una de ellas (Ellis *et al.*, 1988).

Las unidades de ADN 5S se organizan en uno o varios clusters cuya localización difiere de la del ADNr. En algunas especies como cebada, trigo o centeno el ADN 5S se localiza en los mismos cromosomas que el ADNr (Appels *et al.*, 1980; Dvorak *et al.*, 1989; Mukai *et al.*, 1990; Lagudah *et al.*, 1991), pero en la mayor parte de las especies su localización cromosómica difiere de la del ADNr (Ellis *et al.*, 1988; Lapitan *et al.*, 1991). La organización de los clusters de ADN 5S ha sido investigada mediante electroforesis de pulso cambiante en el guisante (Ellis *et al.*, 1988) y en tomate (Lapitan *et al.*, 1991). En ambos casos se ha demostrado que los clusters de ADN 5S están formados únicamente por unidades ininterrumpidas de ADN 5S.

1.1.1.4. EL ADN TELOMÉRICO.

El concepto funcional de telómero deriva de los estudios citogenéticos que realizaron H.J. Müller (1938) en *Drosophila melanogaster* y B. McClintock (1941, 1942) en *Zea mays*. Estos autores demostraron que los extremos de los cromosomas son estructuras especializadas, sin las cuales los cromosomas serían inestables. Además de esta función, los telómeros también pueden estar implicados en mantener una organización tridimensional de la cromatina en los núcleos interfásicos, como consecuencia de una interacción entre los telómeros de distintos cromosomas o debido a la asociación de los telómeros con la membrana nuclear (Fussell, 1984). En los últimos años, el análisis molecular de la estructura de los telómeros ha puesto de manifiesto que éstos pueden facilitar la replicación completa de los extremos de los cromosomas previniendo la degradación progresiva de los extremos cromosómicos durante la replicación (Blackburn y Szostak, 1984).

Los primeros estudios sobre la estructura y secuencia específica de los telómeros de los cromosomas de eucariotas se llevaron a cabo en el protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila* (Blackburn y Gall, 1978). Se demostró que el telómero de *Tetrahymena* estaba formado por unidades repetidas en tándem de la secuencia GGGTT. Desde entonces, el análisis de la secuencia de los telómeros de muchos eucariotas inferiores (ver revisión de Zakian, 1989) y la reciente clonación y caracterización de los telómeros de la planta *Arabidopsis thaliana* (Richards y Ausubel, 1988) y del telómero humano (Moyzis *et al.*, 1988) ha revelado que la estructura y secuencia de los telómeros de todos los cromosomas eucarióticos es bastante similar (Meyne *et al.* 1989). Básicamente, el ADN telomérico está formado por un oligonucleótido corto que se puede englobar bajo la secuencia consenso $(T/A)_n G_{1-8}$, el cual se repite en tándem en un número variable de copias en cada telómero (Meyne *et al.*, 1989, Zakian, 1989, Ganai *et al.*, 1991). Esto hace que las dos cadenas de ADN telomérico sean asimétricas: una de ellas es rica en G mientras

que la otra lo es en C. El extremo 3' de la cadena rica en G está siempre orientado hacia el extremo del cromosoma y forma una estructura en horquilla por un apareamiento entre los residuos de G (Blackburn, 1990).

La presencia de una número variable de copias de la unidad básica de repetición hace que la longitud del ADN telomérico no sólo varíe entre los telómeros de unas especies a otras (Brown, 1992), sino también entre los cromosomas de una misma especie (Zakian, 1989). Además, la longitud del ADN telomérico en un cromosoma puede aumentar o disminuir de una generación a la siguiente, debido a que los telómeros no pueden replicarse completamente mediante el mecanismo normal de la replicación del ADN (Shippen-Lentz y Blackburn, 1990). Aunque se sabe de la existencia de una enzima específica (telomerasa) capaz de elongar la cadena rica en G (Blackburn, 1991) e impedir que exista una pérdida progresiva de ADN a nivel telomérico durante la replicación semiconservativa del ADN, sin embargo, el número medio de copias de ADN telomérico se mantiene a través de un balance entre los procesos capaces de elongar el telómero (replicación o recombinación) y los que originan una disminución en el tamaño del ADN telomérico (replicación incompleta o degradación por exonucleasas). Por tanto, el telómero puede considerarse como una estructura dinámica sujeta a cambios continuos. De hecho, estudios recientes en ratón (Kipling y Cooke, 1990) y en plantas (Broun *et al.*, 1992) han puesto de manifiesto la existencia de un alto grado de polimorfismo para el tamaño de los clusters de ADN telomérico. Comparadas con otras sondas de ADN hipervariable tales como los minisatélites o las secuencias relacionadas con el ADN del fago M13, el ADN telomérico es uno de las regiones más variables del genoma de plantas (Broun *et al.*, 1992).

1.1.2. EVOLUCION Y FUNCION DEL ADN REPETIDO

La evolución del ADN repetido, al igual que otras regiones del genoma, está íntimamente relacionada con su función. Como hemos indicado anteriormente, las regiones que no se transcriben dentro del ADNr o del ADN 5S muestran mayores cambios que aquellas que se transcriben para dar los ARNs ribosómicos y que, por tanto, están sujetas a una presión selectiva mucho mayor. No obstante, se desconoce si el ADN satélite y otras secuencias de ADN repetido disperso tienen alguna función. La presencia de ADN satélite en todos los organismos eucariotas y su preferencia a localizarse en sitios cromosómicos similares (centrómeros y telómeros principalmente) ha permitido hacer algunas especulaciones acerca de su posible función en determinados procesos tales como el mantenimiento de la estructura cromosómica o la estructura tridimensional de los núcleos interfásicos (John y Miklos, 1979; Manuelidis, 1982) o en procesos de la línea germinal tales como apareamiento, segregación o recombinación (Flavell, 1986a). Estas posibles funciones del ADN satélite podrían explicar las homologías encontradas entre distintos ADNs satélites de animales y plantas (Brutlag, 1980; Grellet *et al.*, 1986; Martínez Zapater *et al.*, 1986). No obstante, si el ADN satélite carece de función y se acumula en el genoma simplemente por ser neutro a la selección (Dollittle y Sapienza, 1980; Orgel y Crick, 1980), estas homologías entre distintos ADNs satélites se deberían a la amplificación de secuencias conservadas en distintas especies (Martínez Zapater *et al.*, 1986).

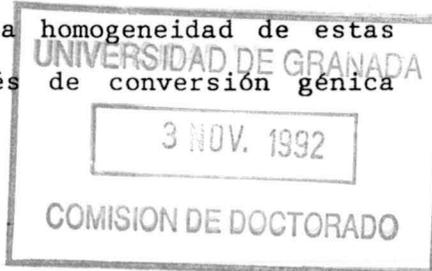
Sea cual sea la función del ADN repetido, lo que sí se sabe es que los miembros de una misma familia mantienen un alto grado de homología. Así, por ejemplo, aunque la mayor parte de las copias de ADN ribosómico de una especie permanezcan inactivas, éstas se mantienen homogéneas tanto en las regiones génicas como en los espaciadores intergénicos. Por tanto, independientemente del grado de variación de una familia de ADN repetido, la homología entre los miembros de cada familia es mayor dentro de una especie que entre

especies relacionadas. Para explicar esta evolución concertada de los miembros de una familia, se han propuesto varios mecanismos: amplificación, intercambios desiguales, conversión génica y transposición (Dover, 1982).

La amplificación es el mecanismo más obvio capaz de generar múltiples copias de una misma secuencia. Aunque los mecanismos capaces de amplificar una determinada secuencia se desconocen, el análisis de la estructura de las unidades de ADN satélite refleja que ciertas partes del mismo han sufrido varias rondas de amplificación y divergencia a lo largo de su evolución (Bedbrook *et al.*, 1980; Flavell, 1982a; Grellet *et al.*, 1986).

El apareamiento y recombinación entre distintas unidades de ADN repetido en tándem es otro de los mecanismos capaces no sólo de homogeneizar una familia de ADN repetido sino también de explicar las variaciones intra e interespecíficas para el número de copias dentro una misma familia (Smith, 1976). Muchas de las características del ADN satélite (Brutlag, 1980), así como las variaciones en el espaciador intergénico o en el número de copias para el ADNr (Rogers y Bendich, 1987), parecen tener su origen en intercambios desiguales. No obstante, la conversión génica puede también jugar un papel importante en la evolución de las secuencias repetidas en tándem tales como el ADN satélite (Grellet *et al.*, 1986) o el ADN ribosómico (Hillis *et al.*, 1991).

El análisis de la estructura del ADN repetido disperso ha puesto de manifiesto que la transposición puede jugar un papel importante en la amplificación y dispersión de estas secuencias por todo el genoma (Smyth, 1991). Puesto que es menos probable que se produzcan apareamientos e intercambios desiguales entre distintas secuencias de ADN repetido disperso, se ha sugerido que la homogeneidad de estas familias se mantiene principalmente a través de conversión génica (Dyson y Sherrat, 1985).



Por otro lado, es digno de mencionar que el ADN repetido localizado en distintos sitios de cromosomas no homólogos, también se mantiene homogéneo (Arheim *et al.*, 1980; Suzuki *et al.*, 1990; Garrido-Ramos *et al.*, 1992; Jantsch *et al.*, 1990). Esto implica que los mecanismos capaces de homogeneizar una familia de ADN repetido no sólo deben de ocurrir entre cromátidas hermanas o cromosomas homólogos sino que deben de afectar también a unidades repetidas localizadas en diferentes cromosomas. Se ha propuesto que la homogeneización de las distintas secuencias del ADN satélite localizadas en distintos sitios cromosómicos se vería facilitada si estas regiones se mantienen en estrecho contacto durante algún estadio del ciclo celular (Flavell, 1982b; Schweizer y Loidl, 1987). Así, en *Sus scrofa*, se ha observado que las regiones de heterocromatina capaces de asociarse durante la primera profase meiótica están formadas por unidades de ADN satélite más homogéneas que las de aquellas que no se asocian (Jantsch *et al.*, 1990). Por tanto, es posible que la asociación de la heterocromatina durante la primera profase meiótica facilite la recombinación entre el ADN heterocromático de cromosomas no homólogos y por tanto, la homogeneización de un ADN satélite localizado en distintos cromosomas (Schwarzacher *et al.*, 1984; Schweizer *et al.*, 1987).

1.2. LOS CROMOSOMAS Bs

Los cromosomas Bs son cromosomas extras que aparecen en forma de polimorfismos en multitud de especies animales y vegetales, siendo totalmente prescindibles para el desarrollo normal de los individuos que los portan (Jones y Rees, 1982). Existen además otras características que definen a estos cromosomas:

a) Son morfológicamente diferentes de los cromosomas estándar de las especies (As), siendo normalmente más pequeños y, en la mayoría de los casos, heterocromáticos.

b) Los cromosomas Bs no se aparean con ningún miembro del complemento cromosómico normal durante la meiosis, lo que los distingue de elementos aneuploides o polisómicos.

c) La herencia que muestran estos cromosomas es normalmente no mendeliana, exhibiendo a menudo inestabilidad y no disyunción durante la meiosis. En algunas especies, los cromosomas Bs están sujetos a fuertes mecanismos de acumulación. Sin embargo, el aumento del número de Bs suele ser perjudicial, existiendo un límite en el número máximo de Bs que un individuo de una determinada especie puede tolerar. Por tanto, su mantenimiento en las poblaciones naturales está determinado por mecanismos opuestos que acumulan o disminuyen el número de cromosomas Bs en las poblaciones (Jones y Rees, 1982). Pueden también presentar inestabilidad mitótica, en cuyo caso, el número de Bs puede variar entre las distintas células de un mismo individuo.

d) Aunque los cromosomas Bs de muchas especies no muestran ningún efecto sobre los individuos que los portan, en otros casos, se han descrito efectos muy variables. Los cromosomas Bs pueden reducir la fertilidad (Suja *et al.*, 1986; Hewitt *et al.*, 1987), provocar anormalidades durante la meiosis (Parker *et al.*, 1981), reducir la tasa de desarrollo (Harvey y Hewitt, 1979), etc. En la mayor parte de los casos los efectos que producen son acumulativos, dependiendo más del número que presenta el individuo que de la presencia o ausencia de éstos (Jones y Rees, 1982).

1.2.1. EL ADN DE LOS CROMOSOMAS Bs

Los cromosomas Bs han sido normalmente considerados heterocromáticos. No obstante, el desarrollo de las técnicas de bandeo C ha puesto de manifiesto que la cantidad de heterocromatina varía entre los cromosomas Bs de unas especies a otras (Jones y Rees, 1982). Además, los cromosomas Bs de muchas especies de plantas son totalmente eucromáticos (Jones, 1975; Greilhuber y Speta, 1976). Es digno de mencionar el hecho de que los cromosomas Bs de *Picea glauca*, aunque heterocromáticos en los núcleos interfásicos, no muestran una reacción

positiva tras el bandeo C (Teoh y Rees, 1977). Esto podría significar que el ADN de los Bs de esta especie, aunque eucromático, muestra una organización diferente respecto a los cromosomas estándar (Jones y Rees, 1982). En otros casos, los cromosomas Bs pueden permanecer condensados en algunos tejidos mientras que aparecen descondensados en otros. Así, los cromosomas eucromáticos de *Phleum doehmeri*, forman cromocentros en los núcleos de las células del grano de polen pero permanecen descondensados en los núcleos interfásicos de las células meristemáticas de la raíz (Joachimiak, 1986).

En general, el ADN de los cromosomas Bs es muy similar al que contienen los cromosomas estándar, siendo pocos los casos en donde se han detectado secuencias de ADN específicas de los cromosomas Bs. El ADN de plantas con y sin cromosomas Bs ha sido principalmente analizado en maíz, centeno y trigo (Chilton y McCarthy, 1973; Rimpau y Flavell, 1976; Dover, 1976). Comparando los patrones de renaturalización y de ultracentrifugación en gradientes de densidad entre el ADN de plantas con y sin cromosomas Bs en maíz (Chilton y McCarthy, 1973; Timmis *et al.*, 1975), centeno (Rimpau y Flavell, 1976) y trigo (Dover, 1976), los autores concluyen que ambos tipos de ADNs muestran la misma composición en bases, así como la misma proporción de secuencias de ADN repetido y de secuencia única. La ultracentrifugación en gradiente de densidad no mostraba tampoco ningún pico de ADN satélite en el ADN de plantas con cromosomas Bs. Lima de Faria *et al.* (1983) comparan el patrón de digestión del ADN de plantas de *Secale cereale* con y sin cromosomas Bs con cuatro enzimas de restricción, no encontrando tampoco diferencias en cuanto al ADN repetido en ambos tipos de ADNs. Sin embargo, Appels *et al.* (1978) encontraron que el ARNc obtenido a partir del ADN de plantas normales de centeno hibridaba *in situ* con la bandas C teloméricas de los cromosomas As pero no con las de los cromosomas Bs. Esto podía indicar que las bandas C terminales de los cromosomas Bs difieren en composición respecto a las que presentan los cromosomas normales.

Resultados similares se han obtenido con los cromosomas Bs de animales (Dover y Henderson, 1976; Klein y Eckhardt, 1976). No obstante, en *Pseudococcus obscurus*, la hibridación *in situ* con ARNc transcrito *in vitro* a partir de ADN de individuos con y sin cromosomas Bs, ha puesto de manifiesto que el ADN repetido de los cromosomas Bs de esta especie difiere del que presentan los cromosomas estándar (Klein y Eckhardt, 1976).

El análisis mediante hibridación *in situ* con ADN satélite obtenido por ultracentrifugación o de secuencias clonadas de ADN repetido en sistemas con cromosomas Bs, ha indicado que ciertas familias de ADN repetido pueden localizarse tanto en los cromosomas As como en los Bs. John *et al.* (1986) ha demostrado que el ADN satélite 1 de *Atractomorpha similis* se localiza sobre las bandas C distales de los cromosomas A y B pero no sobre las bandas C proximales de ambos tipos de cromosomas. De igual forma, Amos y Dover (1981) estudiaron la distribución de varios ADNs satélites en los cromosomas A y B de varias especies de *Glosina* llegando a la conclusión de que estos se distribuyen sobre determinadas bandas C tanto de los cromosomas As como de los Bs. El uso de sondas de ADN repetido en experimentos de hibridación *in situ* ha demostrado también que, en el maíz, el ADN repetido que forma parte de los knobs de los cromosomas As, también hibrida con la heterocromatina paracentromérica de los Bs. Esta similitud entre ambos tipos de heterocromatina sugiere que el centrómero de los Bs del maíz puede haberse originado a partir de secuencias neocentroméricas presentes en la heterocromatina de los knobs de los cromosomas As (Peacock *et al.*, 1981; Viotti *et al.*, 1985).

Todos estos datos indican que el ADN de los cromosomas Bs es muy similar al que se encuentra en los As, no apareciendo en ellos ninguna amplificación ni ninguna secuencia adicional con respecto a las que presenta el genoma estándar. Sin embargo, recientemente se han detectado secuencias de ADN repetido específicas de cromosomas Bs. La

caracterización citogenética de los individuos de la avispa *Nasonia vitripennis* con el elemento genético psr (paternal sex ratio), capaz de condensar y hacer que se eliminen los cromosomas de origen paterno convirtiendo las hembras diploides en machos haploides, ha demostrado que esta actividad reside en los cromosomas Bs. Además, estos cromosomas Bs contienen al menos tres familias de ADN repetido que no presenta el genoma normal de la especie (Nur *et al.*, 1988; Eickbush *et al.*, 1992). Por lo que respecta a los cromosomas Bs de plantas, Sandery *et al.* (1990) han puesto de manifiesto la existencia de una familia de secuencias repetidas en los cromosomas Bs de *Secale cereale*. Esta familia, aunque específica de los cromosomas Bs de centeno, parece estar relacionada con otra familia de ADN repetido formada por repeticiones de 480 pb localizada en la heterocromatina terminal de los cromosomas As, estando también presente, aunque con una organización diferente, en *Secale vavilovii* (Sandery *et al.*, 1990). En los cromosomas Bs de *Brachycome dichromosomatica* se ha encontrado también otra familia de ADN satélite que, aunque no está presente en el genoma estándar de la planta, muestra homología con el ADN de una especie relacionada, *B. ciliaris* (John *et al.*, 1991).

Cabe señalar también que, aunque los pocos efectos detectados en los cromosomas Bs reflejan la presencia de pocos genes funcionales en estos cromosomas, ello no significa que sean totalmente inactivos. Son muchos los casos en donde se ha demostrado la presencia de NORs activos en los cromosomas supernumerarios (Guillén y Ruiz Rejón, 1984; Cabrero *et al.*, 1987; Brockhouse *et al.*, 1989; Maluszynska y Schweizer, 1989). Sin embargo, se desconoce si los cromosomas Bs poseen genes de secuencia única activos. Así, aunque Ruiz Rejón *et al.* (1980) detectaron que la actividad para la enzima esterasa E-1 en *Scilla autumnalis* estaba asociada a la presencia de cromosomas Bs, posteriormente se demostró que el cromosoma B solo es capaz de regular la actividad génica de este locus, de forma que el gen para la esterasa E-1 está codificado por el genoma estándar, pero solo se expresa en individuos con cromosomas Bs (Oliver *et al.*, 1982).

1.2.2. ORIGEN Y EVOLUCION DE LOS CROMOSOMAS Bs

El origen y evolución de los cromosomas supernumerarios ha sido discutido por numerosos autores (Amos y Dover, 1981; Jones y Rees, 1982; Sapre y Deshpande, 1987; Green, 1990). Sin embargo, el actual conocimiento de la estructura molecular así como el comportamiento de los cromosomas Bs no es aún suficiente para resolver este problema.

Como hemos indicado anteriormente, el análisis molecular del ADN de individuos con y sin cromosomas Bs ha mostrado que, en general, los cromosomas Bs tienen una composición similar a la de los cromosomas estándar. Ello sugiere que los cromosomas Bs no se originan de *novo* sino que deben tener su origen en los cromosomas del complemento estándar. Inicialmente existirían como elementos polisómicos, normalmente trisómicos, generados mediante mecanismos tales como misdivisión translocaciones recíprocas, fisiones, no-disyunción, etc. (Jones, 1985), y que mantendrían una homología considerable con el cromosoma del que se originaron. No obstante, se sabe que los cromosomas Bs no se aparean con ningún cromosoma normal del complemento. Es por ello que el origen de los cromosomas Bs debe de conllevar también una diferenciación del cromosoma trisómico que impida el apareamiento y la formación de quiasmas con los cromosomas estándar. Esta pérdida de homología debe ser rápida ya que de no ser así se esperaría que en ciertos casos se diesen apareamientos entre los cromosomas A y B (Jones y Rees, 1982). Por tanto, aunque a lo largo de su evolución el ADN del cromosoma B esté sujeto a cambios, esta pérdida rápida de homología no puede deberse solo a una diferenciación rápida en la composición y/u organización del ADN cromosómico del B. Deben existir otros mecanismos capaces de provocar una diferenciación rápida que impida no únicamente el apareamiento entre los As y los Bs sino también la supresión de la actividad génica que normalmente caracteriza a estos cromosomas. Puesto que muchos cromosomas Bs son heterocromáticos, la heterocromatinización facultativa o constitutiva podría ser uno de los mecanismos capaces de

explicar el aislamiento del cromosoma B respecto de su cromosoma A ancestral así como de la pérdida rápida de actividad génica en los cromosomas supernumerarios (Jones y Rees, 1982). En este sentido, Peeters *et al.* (1985) encontraron que los cromosomas supernumerarios que se originan *de novo* en *Zea mays* se hacen más heterocromáticos en la siguiente generación.

Recientemente, Green (1990) ha propuesto que la diferenciación y evolución de los cromosomas Bs está sujeta al proceso denominado "Muller's ratchet" (Muller, 1964), previamente propuesto para explicar la diferenciación y degeneración de los cromosomas sexuales. Si los cromosomas supernumerarios derivan del complemento normal a través de una trisomía, la actividad génica que puedan portar los cromosomas Bs se vería cubierta por las secuencias presentes en el cromosoma progenitor. Así, la relajación de la selección en las secuencias que forman parte de los Bs hace que éstos vayan acumulando mutaciones recesivas, deleciones y heterocromatinizándose de generación en generación, lo que conllevaría una pérdida de actividad génica y la adquisición de heterocromatina en los cromosomas Bs (Green, 1990). La degeneración del cromosoma supernumerario mediante este mecanismo requeriría además la supresión de recombinación entre los cromosomas Bs y el cromosoma A del que derivan. No obstante, los mecanismos capaces de impedir el apareamiento y la recombinación no se conocen. Green (1990) ha sugerido que los cromosomas homólogos progenitores de los Bs, puesto que son más grandes y comparten un mayor número de secuencias, se aparean antes entre sí que con los cromosomas Bs más pequeños.

En otros casos, se ha propuesto que los cromosomas Bs pueden originarse como consecuencia de hibridación interespecífica (Jackson, 1960; Sapre y Deshpande, 1987). Así, los cromosomas Bs de varias especies de los géneros *Allium* (Loidl, 1982; Guillén y Ruiz Rejón, 1984) *Crepis* (Cameron, 1934; Babcock, 1947; Maluszynska y Schweizer, 1989) presentan actividad NOR. Aunque estos cromosomas Bs con

actividad NOR pueden haberse originado de forma independiente en cada una de las especies de cada género, es también posible que el cromosoma supernumerario con el NOR se haya originado en una especie ancestral común o en una de las especies del género y haya sido transferido a las demás mediante hibridación (Green, 1990).

1.2.3. LOS CROMOSOMAS Bs DE C. capillaris

Los cromosomas Bs de *C. capillaris* fueron descritos y estudiados por primera vez por Rutishauser (1960) en poblaciones naturales de Suiza. A partir de entonces son muchos los autores que han estudiado la citogenética, la herencia y los efectos de los cromosomas Bs de esta especie. Tanto los cromosomas Bs encontrados inicialmente en poblaciones suizas como los que posteriormente se han encontrado en poblaciones naturales de Gran Bretaña (Whitehouse *et al.*, 1981) presentan la misma morfología. Se trata de cromosomas metacéntricos cuyo tamaño es aproximadamente un tercio respecto al cromosoma 2, el más pequeño de complemento estándar de la especie, compuesto por tres parejas de cromosomas ($2n=6$).

El estudio de los cromosomas Bs de *C. capillaris* mediante bandeo C pone de manifiesto la presencia de dos regiones de heterocromatina localizadas a ambos lados del centrómero que dan lugar a la banda C más grande del complemento, y que constituye aproximadamente un 35% de la longitud del cromosoma supernumerario (Maluszynska, 1990). Sin embargo, y a pesar de su naturaleza parcialmente heterocromática, el ADN de los cromosomas Bs de *C. capillaris* se sintetiza durante todo el periodo S del ciclo celular mientras que, por ejemplo, en los Bs parcialmente heterocromáticos del maíz la síntesis tiene lugar al final del periodo S (Abraham *et al.*, 1968).

Recientemente, Maluszynska y Schweizer (1989) han demostrado la presencia de cistrones ribosómicos simétricamente localizados en ambos brazos de cromosoma B de *C. capillaris*, tanto mediante tinción

argéntica como mediante hibridación *in situ* con ADN ribosómico. Estos dos datos indican que el cromosoma B tiene una organización isocromosómica. El análisis de los complejos sinaptonémicos en células madre del polen ha puesto de manifiesto que los cromosomas Bs de *C. capillaris* muestran tanto apareamientos intercromosómicos como apareamientos entre brazos de un mismo cromosoma lo que demuestra, de nuevo, que el B de esta especie es un isocromosoma (Jones *et al.*, 1989).

El cromosoma B de *C. capillaris* contiene aproximadamente 0.78 pg de ADN, lo que no es mucho comparado con el genoma diploide de la especie (8.69 pg) (Maluszynska, 1990), pero, sin embargo, supera el contenido en ADN del genoma haploide de ciertas plantas superiores tales como el de *A. thaliana* o el del arroz (Bennett y Smith, 1991). En *C. capillaris*, el contenido de ADN por unidad de longitud del cromosoma es menor en los cromosomas Bs (0.27 pg/um) que en los cromosomas As (0.4 pg/um) (Maluszynska, 1990), a pesar de que los cromosomas Bs de esta especie son parcialmente heterocromáticos. Estos datos contrastan con los obtenidos para los cromosomas Bs heterocromáticos o parcialmente heterocromáticos del centeno (Jones y Rees, 1968) o del maíz (Ayonoadu y Rees, 1964) en donde la cantidad de ADN por unidad de longitud del cromosoma es mayor en los cromosomas Bs que en los cromosomas As.

En las poblaciones naturales de *C. capillaris*, el número de cromosomas Bs por planta varía entre 0 y 2. Sin embargo, el cruzamiento artificial entre plantas con Bs ha dado lugar a plantas con hasta 5 cromosomas Bs en sus tejidos somáticos (Maluszynska, 1990). El número de Bs se mantiene constante en las células de la raíz, la hoja y las brácteas (Parker *et al.*, 1989). Sin embargo, el cromosoma B de *C. capillaris* muestra no-disyunción somática durante distintos estadios del desarrollo de la inflorescencia, lo que origina variaciones en el número de cromosomas Bs entre células madres del polen dentro de una misma flor, entre las flores de un capítulo y

entre los capítulos de una inflorescencia (Parker *et al.*, 1989). Aunque el número de Bs en las inflorescencias es variable, en la mayor parte de las plantas el número de Bs en las flores es superior al que aparece en los tejidos somáticos (Rutishauser y Röthlisberger, 1966, Whitehouse *et al.*, 1981; Parker *et al.*, 1989). Esto hace que la herencia de los Bs esté fuertemente favorecida con respecto a lo que se esperaría si los cromosomas Bs se transmitiesen de forma mendeliana, de tal forma que la media de transmisión es de 0.90 a través del polen y de 0.83 a través de la línea femenina (Parker *et al.*, 1989).

2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Tanto los cromosomas Bs de *C. capillaris* como los de otras especies han sido ampliamente estudiados a nivel citogenético y poblacional. Sin embargo, hasta el momento, existen muy pocos estudios acerca de la estructura molecular de estos cromosomas.

El objetivo fundamental del presente trabajo es hacer un análisis comparativo entre el ADN de los cromosomas A y B de *C. capillaris*. En concreto, se pretenden resolver los siguientes aspectos:

1. Si los cromosomas Bs de *C. capillaris* están compuestos por secuencias de ADN específicas o si, por el contrario, poseen secuencias similares a las que existen en los cromosomas As.

2. Si la composición de las regiones de heterocromatina constitutiva o bandas C de los cromosomas A y B es la misma, o si difieren en secuencia y/o en organización.

3. Puesto que los cromosomas Bs de *C. capillaris* poseen ADN_r, se pretende comparar los genes de ADN_r de los cromosomas A y B de *C. capillaris*, así como analizar el posible origen del cromosoma B de esta especie a partir del cromosoma NOR.

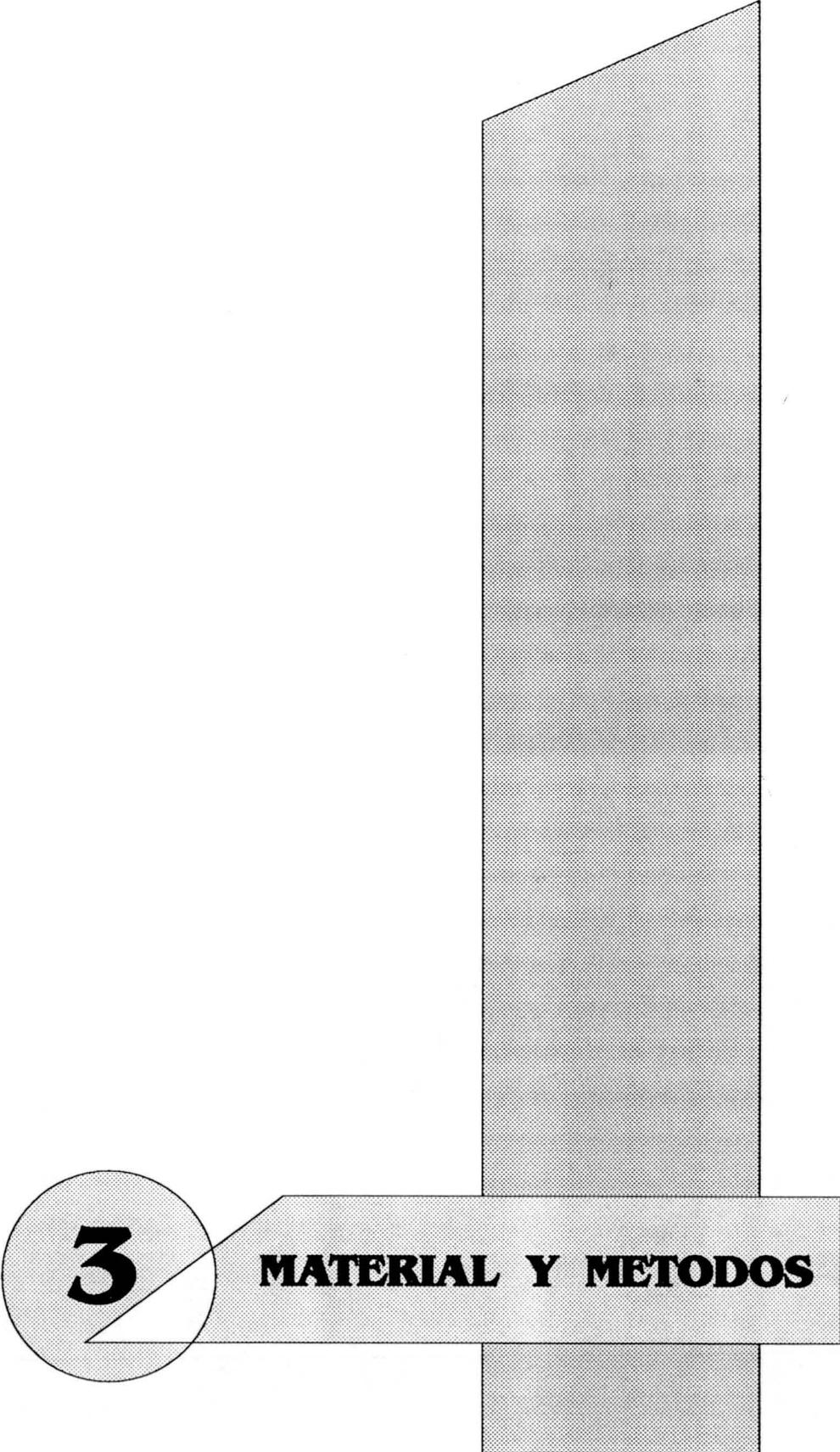
4. Analizar la organización y distribución de otras secuencias de ADN repetido tales como el ADN 5S y el ADN telomérico en los cromosomas A y B de esta especie.

Además de iniciar una caracterización molecular de los Bs, lo que es fundamental para aclarar el origen y evolución de este material genético, los resultados que se obtengan de este estudio también nos permitirán analizar la organización, evolución y distribución de distintas familias de ADN repetido en el genoma estándar de *C.*

capillaris. En este sentido nos proponemos analizar los siguientes aspectos:

a) La caracterización molecular de la heterocromatina de *C. capillaris*. Además, teniendo en cuenta que *C. capillaris* ha sido un especie modelo para estudiar la disposición de los cromosomas en los núcleos, pretendemos aclarar el papel que juega la disposición cromosómica en la distribución y evolución del ADN heterocromático.

b) La variabilidad y distribución del ADN ribosómico 18S + 25S y del ADN 5S en el genoma estándar de *C. capillaris*.



3

MATERIAL Y METODOS

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

La especie objeto de estudio en este trabajo ha sido *Crepis capillaris* (Compositae). Además, se han utilizado varias especies del género *Crepis*: *C. biennis*, *C. setosa*, *C. dioscoridis*, *C. rubra*, *C. foetida* y *C. zacintha*.

Todo el material vegetal ha sido obtenido a partir de semillas. Las semillas de *C. capillaris* fueron proporcionadas por el Dr. R.N. Jones (University College of Wales, Aberystwyth), y proceden de poblaciones naturales de Suiza, las de *C. zacintha*, por el Dr. J. Graú (Inst. f. Systematische Botanik, Universität München), y las del resto de las especies fueron proporcionadas por el Jardín Botánico de Kew, Inglaterra.

Las semillas se sembraron en macetas hasta obtener plantas adultas. Con el fin de determinar el número de cromosomas Bs de cada planta, los meristemas apicales de las raíces se trataron con 0.05% de colchicina durante 4 horas, se fijaron en etanol : ácido acético (3:1) y se conservaron a 4°C. Las yemas florales de cada planta se fijaron en etanol : ácido acético (3:1) y se conservaron a 4°C para analizar la meiosis. Para la obtención de ADN genómico, las hojas de cada planta se lavaron abundantemente con agua, se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron individualizadas a -80°C.

La obtención de preparaciones mitóticas se realizó a partir de meristemas apicales de semillas germinadas. Las semillas se germinaron entre papel de filtro humedecido en placas de Petri durante dos a cinco días. Tras la germinación, las semillas se trataron con 0.05% de colchicina durante 4 horas, se fijaron en alcohol:ácido acético (3:1) y se conservaron en el frigorífico.

3.2. PREPARACION DE ADN CELULAR DE PLANTAS.

La obtención de ADN total de *Crepis capillaris*, así como de las demás especies de *Crepis* analizadas, se llevó a cabo a partir de hojas siguiendo el método de Dellaporta *et al.* (1983). El ADN extraído de esta forma se purificó adicionalmente mediante varias extracciones con un volumen de fenol y una última extracción con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Tras la purificación, el ADN se precipitó con etanol, se lavó con etanol al 70% y se disolvió en 100-200 μ l de tampón TE.

La cantidad y calidad del ADN obtenido se determinó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.7% con el uso de marcadores de peso molecular conocido (ADN del fago lambda digerido con Hind III). El ADN extraído mediante este método era de aproximadamente 30-50 Kb, resultando adecuado a la hora de digerirlo con distintas endonucleasas de restricción y de utilizarlo en análisis de Southern-blot. No obstante, en la mayor parte de las extracciones realizadas, el ADN estaba contaminado con polisacáridos y resultaba inadecuado para ciertos propósitos tales como reacciones de ligación y marcaje. Es por ello por lo que, en determinadas ocasiones, el ADN extraído mediante el método descrito por Dellaporta *et al.* (1983) se purificó adicionalmente usando la técnica propuesta por Rogers y Bendich (1988).

En aquellos casos en los que se necesitó ADN lo suficientemente puro como para poderlo medir sin error en un espectrofotómetro a 260 nm (en la estimación del número de copias de una familia de ADN repetido mediante dot blot, por ejemplo), el ADN obtenido mediante el método de Dellaporta *et al.* (1983) se trató con 100 μ g/ml de ARNasa y se purificó adicionalmente con el kit "Magic PCR PrepsTM DNA Purification System" (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3. TECNICA DE REASOCIACION DE ADN GENOMICO EN UNA EMULSION DE FENOL Y FORMAMIDA (F-PERT).

Con el fin de identificar secuencias específicas del ADN de los cromosomas Bs se llevó a cabo la técnica de reasociación de ADN genómico en una emulsión de fenol propuesta por Kohne *et al.* (1977), y modificada posteriormente por Casna *et al.* (1986). Para ello, se utilizó el ADN extraído mediante el método de Dellaporta *et al.* (1983) y purificado posteriormente mediante el método de Rogers y Bendich (1988). Los pasos seguidos fueron:

1) 5 µg de ADN de plantas de *C. capillaris* con 2 Bs se digirieron con 1 unidad del enzima Mbo I por µg de ADN durante 2 horas en las condiciones recomendadas por el fabricante (Promega). A la digestión de restricción se le añadió ARNasa a la concentración de 100 µg/ml con el fin de eliminar el ARN. Tras la digestión, el ADN se purificó sucesivamente mediante extracción con 1 vol. de fenol, 1 vol. de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una extracción final con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Tras precipitar el ADN con etanol, éste se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 50 µl de agua estéril.

2) 300 µg de ADN de plantas sin cromosomas Bs se trataron con ARNasa, se purificaron mediante extracción con fenol y cloroformo:alcohol isoamílico al igual que el ADN de plantas con Bs, y se precipitó con etanol. El ADN se resuspendió en 1 ml de agua estéril y se rompió mediante sonicación en fragmentos de aproximadamente 600 pb.

3) 1 µg de ADN de plantas con 2Bs digerido con Mbo I se mezcló con 200 µg de ADN de plantas sin Bs previamente roto mediante sonicación. La mezcla se desnaturalizó a 100°C durante 10 min y se dejó enfriar en hielo.

3) La reasociación del ADN desnaturalizado se realizó en 2M de tiocianato potásico, 10 mM de Tris-ClH pH 8, 0.1 mM EDTA pH 8, 8% de formamida (Merck) y 30% de fenol (Ultrapuro, BRL) a una concentración final de ADN de 50 µg/ml y en un tubo de polipropileno de 30 ml. El ADN se dejó reasociar a temperatura ambiente durante 48 horas con una leve agitación para mantener el fenol en emulsión.

4) Tras la reasociación, la fase acuosa se recuperó mediante dos extracciones con 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), y el ADN se precipitó con 5 vol. de etanol y se resuspendió en agua estéril.

5) 10 µg de ADN reasociado se ligaron con 100 ng de plásmido pUC19 previamente digerido con Bam HI. La ligación se realizó a temperatura ambiente en un volumen final de 50 µl con 3 U. de DNA ligasa de T4 en las condiciones que recomienda el fabricante (Boehringer-Mannheim).

6) El producto de la ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 alfa, y los clones recombinantes se identificaron mediante el ensayo blanco/azul en placas de LB conteniendo IPTG y X-gal (Sambrook *et al.*, 1989).

3.4. IDENTIFICACION, AISLAMIENTO Y CLONACION DE ADN ALTAMENTE REPETIDO.

3.4.1. Identificación y aislamiento de ADN altamente repetido

La identificación de ADN altamente repetido en el genoma de *C. capillaris* se llevó a cabo mediante el análisis de las bandas resultantes tras digerir el ADN total de la planta con enzimas de restricción, separación del mismo en un gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

Las digestiones se realizaron con 5 unidades de enzima por μg de ADN en el tampón recomendado por el fabricante (Boehringer-Mannheim o Promega) durante 8-16 horas. Los fragmentos de restricción obtenidos tras la digestión se separaron mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa del 0.7-1.5% en tampón TBE 0.5 X (1 X TBE: Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 1mM) conteniendo 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio. Identificamos así tres bandas de ADN repetido de aproximadamente 360, 260 y 160 pb las cuales surgen después de digerir el ADN total de *C. capillaris* con las enzimas de restricción Eco RI, Dra I y Hind III, respectivamente.

Para clonar el ADN repetido presente en estas tres bandas, 10 μg de ADN de *C. capillaris* se digirieron con las enzimas Eco RI, Dra I o Hind III en las condiciones descritas anteriormente. Los fragmentos de restricción resultantes se separaron en un gel de agarosa NuSieve GTG (FMC) de bajo punto de fusión al 3% en tampón TAE (Tris 0.04M, ácido acético 0.04 M, EDTA 1 mM) conteniendo 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio. Tras observar el ADN en un transiluminador de luz ultravioleta, las bandas de interés se escindieron del gel con la ayuda de un bisturí y se colocaron en un tubo de microcentrífuga.

3.4.2. Clonación del ADN repetido aislado de geles de agarosa

La clonación de los fragmentos de restricción contenidos en cada una de las bandas de ADN repetido obtenidas del gel se llevó a cabo con la siguiente metodología:

- 1) El plásmido pUC19 se digirió con las enzimas Eco RI, Hind II o Hind III en las condiciones recomendadas por el fabricante, se purificó mediante extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se precipitó con etanol.

- 2) La ligación del ADN aislado del gel de agarosa al vector pUC19 se realizó siguiendo el protocolo que recomienda FMC para la

ligación y transformación en agarosa NuSieve-GTG fundida. La reacción de ligación se realizó en una proporción vector:inserto de 1:5 con 1 unidad de DNA ligasa de T4 (Boehringer-Mannheim) por cada 10 μ l de volumen final en el tampón de ligación recomendado por el fabricante.

3) La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 alfa obtenidas mediante el método del CaCl_2 descrito por Sambrook *et al.* (1989), y los clones recombinantes se detectaron en placas con medio LB conteniendo ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$), IPTG y X-gal (Sambrook *et al.*, 1989).

3.4.3. Detección de los clones recombinantes con el fragmento de ADN repetido de interés.

La detección de las bacterias recombinantes conteniendo el ADN repetido se realizó mediante hibridación en dot-blot. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

1) Se seleccionaron 50 colonias recombinantes y se cultivaron en medio LB líquido durante una noche. El ADN plasmídico de cada uno de los clones se aisló a partir de 1,5 ml de cultivo siguiendo el método de lisis alcalina propuesto por Sambrook *et al* (1989).

2) El dot-blot del ADN plasmídico de cada uno de los clones se realizó siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante de la membrana de nylon utilizada, Hybond N⁺ (Amersham). El ADN se desnaturalizó en agua hirviendo durante 10 min, se enfrió en hielo durante 5 min y se diluyó con un vol. de 20 X SSC (NaCl 3M, citrato sódico 0.3M). Una muestra de aproximadamente 50 ng de cada plásmido fue aplicada manualmente a la membrana y se dejó secar a temperatura ambiente. El ADN se fijó a la membrana con NaOH 0.2M durante 4 min, y la membrana se lavó con 6 X SSC durante aproximadamente 1 min y se dejó secar a temperatura ambiente.

3) La detección de los clones recombinantes con las secuencias de ADN repetido se realizó hibridando los plásmidos inmovilizados mediante dot-blot con el ADN total marcado de *C. capillaris* o con ADN marcado extraído a partir de la misma banda del gel que se utilizó para clonar (ver apartado 2.5.3). El marcaje y la hibridación se llevaron a cabo utilizando el kit "ECL gene detection system" (Amersham) en las condiciones que se indican en el apartado 3.5.4.

3.5. ANALISIS DE SECUENCIAS DE ADN REPETIDO MEDIANTE HIBRIDACION EN SOUTHERN-BLOT

Con el fin de estudiar la organización y distribución de las secuencias de ADN repetido en el genoma de *C. capillaris* o en el de otras especies de *Crepis* el ADN se digirió con distintas enzimas de restricción, se separó mediante electroforesis en geles de agarosa y se transfirió a membranas de nylon. El ADN fijado a la membrana se hibridó posteriormente con distintas sondas de ADN repetido.

3.5.1. RESTRICCIÓN DE ADN GENÓMICO, ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA A MEMBRANA

Para el análisis de ADN genómico mediante Southern-blot, 2-5 µg de ADN genómico se digirieron con distintas enzimas de restricción en las condiciones recomendadas por el fabricante. En el análisis del ADN telomérico, la digestión previa con la exonucleasa Bal31 se realizó a una concentración de 0.5 U/ml de enzima y 10 µg/ml de ADN en el tampón que recomiendan Richards y Ausubel (1988).

Los fragmentos de restricción resultantes se separaron mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa (0.7-1.5%) en 0.5 X TBE conteniendo 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. La electroforesis se realizó en geles de 20 cm de longitud a 1.5 voltios por cm durante 12 a 16 horas. El ADN fraccionado se visualizó en un transiluminador de

luz ultravioleta, y el gel se fotografió usando la película 665 de Polaroid.

Tras la electroforesis, los fragmentos de restricción se transfirieron a membranas de nylon Hybond N⁺ siguiendo el protocolo propuesto por Sambrook *et al.* (1989). La fijación del ADN a la membrana se realizó con NaOH 0.2M durante 4 minutos tal y como recomienda "Amersham" para el uso del kit de marcaje, hibridación y detección no radiactivo ECL. La membrana se lavó con 6 X SSC durante 1 minuto y se dejó secar a temperatura ambiente.

3.5.2. PLASMIDOS UTILIZADOS

Los clones recombinantes utilizados como sondas para el estudio del ADN repetido de *Crepis* han sido los siguientes:

pTA 71: El plásmido pTA71 contiene un fragmento de restricción Eco RI de 9 Kb que corresponde a una unidad completa del ADN ribosómico 18S, 5.8S y 25S de trigo (Gerlach y Bedbrook, 1979). Este clon fue proporcionado por la Dra. M. Clark (Queen Mary and Westelfield College, Londres).

cp5S: Se trata de un cósmido que contiene un fragmento de restricción Eco RI de aproximadamente 20 Kb formado por unidades repetidas de ADN 5S de guisante (Ellis *et al.*, 1988). El clon fue proporcionado por el Dr. T.H.N. Ellis (John Innes Institute, Norwich, UK).

pAtT4: El plásmido pAtT4 contiene un fragmento de restricción Pst I/Bam HI conteniendo secuencias de ADN telomérico de *Arabidopsis thaliana* (Richards y Ausubel, 1988). El clon fue proporcionado por el Dr. E. Richards (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, EEUU).

Los demás plásmidos recombinantes han sido clonados durante el desarrollo de este trabajo y contienen ADN repetido de *Crepis capillaris*:

pCc21: Contiene un fragmento Mbo I de 58 pb rico en dinucleótidos CA.

pCcE9: Contiene un fragmento Eco RI de 356 pb que corresponde a una unidad de repetición de la familia de ADN repetido Eco RI de *C. capillaris*.

pCcD29: Contiene un fragmento de 259 pb correspondiente a una unidad repetida de la familia Dra I.

pCcH32: Contiene un fragmento de restricción Hind III de 159 pb que corresponde a una de las unidades en tandem de la familia de ADN repetido Hind III.

3.5.3. PURIFICACION DE PLASMIDOS Y DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN UTILIZADOS COMO SONDAS

Los plásmidos conteniendo los fragmentos de ADN utilizados como sondas se amplificaron en *E. coli* y se purificaron mediante lisis alcalina siguiendo el protocolo propuesto por Sambrook *et al.* (1989), con ciertas modificaciones que dependieron de la cantidad de cultivo del que se partía.

En los casos en los que se utilizó el plásmido completo como sonda (en el análisis mediante Southern-blot de los clones recombinantes obtenidos mediante la técnica F-PERT, por ejemplo), éste se purificó a partir de 3 ml de cultivo utilizando el kit "Magic MiniprepsTM DNA purification system" (Promega) y siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los plásmidos se digirieron con la enzimas de restricción adecuadas para liberar los fragmentos de ADN utilizados como sondas, y se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión (SeaPlaque-GTG, FMC) del 0.7-1% en tampón TAE. Las bandas correspondientes a los fragmentos de interés se cogieron del gel y se purificaron mediante varias extracciones con fenol, una extracción con cloroformo: alcohol isoamílico y precipitación con etanol (Sambrook *et al.*, 1989). En aquellos casos en los que los fragmentos de ADN a recuperar eran mayores de 300 pb, éstos se purificaron con el kit "Magic PCR PrepsTM DNA purification system" (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5.4. MARCAJE DE LAS SONDAS E HIBRIDACION

El marcaje de las sondas y la hibridación se llevaron a cabo utilizando el sistema no radioactivo "ECL, direct nucleic acid labelling and detection system" (Amersham), y siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante.

Las membranas se prehibridaron con el tampón de hibridación proporcionado por el fabricante conteniendo NaCl 0.5M y agente bloqueante al 5% durante aproximadamente 1 hora a 42°C. Transcurrido este tiempo, se añadió la sonda previamente desnaturalizada y marcada con la enzima peroxidasa a una concentración de 10 ng por ml de solución de hibridación. Las membranas se incubaron entonces en esta solución durante aproximadamente 12 horas a 42°C y en constante agitación. Después de la hibridación, las membranas se lavaron dos veces en 0.5 X SSC, SDS al 0.4% a 55°C durante 10 min y dos veces en 2 X SSC a temperatura ambiente durante 5 min. Alternativamente, los dos primeros lavados se realizaron en urea 6 M, 0.5 X SSC, SDS al 0.4% a 42°C durante 20 min. Los sitios de hibridación fueron entonces detectados usando las soluciones de detección del kit que contienen peróxido de hidrógeno y luminol. La membranas fueron expuestas durante 30 min a 2 horas con una película autorradiográfica (Hyperfilm ECL,

Amersham) capaz de impresionarse con la luz que se emite en los sitios de hibridación durante la reacción de detección.

En aquellos casos en los que se trataba de estudiar la existencia de secuencias homólogas a los ADNs satélites de *C. capillaris* en distintas especies de *Crepis*, y cuando estas condiciones de hibridación no dieron resultado, se probaron otras condiciones de astringencia más bajas. La hibridación se incubó entonces a 37°C y los dos lavados posteriores a la hibridación se realizaron en urea 4 M, 1.5 X SSC y 0.4% SDS a 37°C durante 20 min.

En aquellas hibridaciones en las que se utilizaron únicamente los insertos de ADN repetido no fue necesario eliminar la sonda antes de reutilizar las membranas en nuevas hibridaciones. Esto se debe a que la peroxidasa utilizada para marcar las sondas se inactiva tras la reacción de detección. Sin embargo, en aquellos casos en los que se utilizó el plásmido entero (vector e inserto), el ADN del vector podría interferir la siguiente hibridación del filtro con otra secuencia clonada en el mismo vector. En estos casos, la sonda se eliminó tras incubar la membrana en una solución hirviendo de SDS al 0.1% y dejando que la temperatura de la solución descendiera a temperatura ambiente.

3.6. ESTIMACION DEL NUMERO DE COPIAS DE LAS FAMILIAS DE ADN REPETIDO ECO RI, DRA I Y HIND III EN EL GENOMA DE C. capillaris

La estimación de la cantidad de ADN que cada una de las familias Eco RI, Dra I y Hind III suponen en el genoma de *C. capillaris*, se determinó comparando las intensidades de hibridación de cada uno de los elementos repetidos (Eco RI, Dra I o Hind III) con diluciones de ADN genómico de la planta o de los plásmidos recombinantes conteniendo las secuencias de ADN repetido de estas tres familias (pCcE9, pCcD29 y pCcH32) inmovilizado en una membrana mediante dot-blot. Concretamente se llevó a cabo de la siguiente forma:

1) Los plásmidos pCcE9, pCcD29 y pCcH32 se amplificaron en *E. coli* y se purificaron utilizando el kit "Minipreps DNA purification system" (Promega). El ADN extraído de *C. capillaris* se purificó con el kit "PCR PrepsTM DNA Purification System" (Promega).

2) Cantidades conocidas de los tres plásmidos linealizados con Bam HI, se desnaturalizaron y se aplicaron en tres filtros separados de nylon tal y como se describe en el apartado 3.4.3. Sobre cada filtro se aplicaron también cantidades conocidas de ADN genómico de *C. capillaris*.

3) Los filtros se hibridaron con el inserto del plásmido adecuado en las condiciones de astringencia más altas descritas para hibridaciones en Southern-blots (apartado 3.5.4) y utilizando el sistema de hibridación y detección ECL.

4) Tras la detección, las señales de hibridación de cada concentración de plásmido y ADN genómico en las placas autorradiográficas se midieron en un fotodensitómetro. La comparación de las señales de cada plásmido y de ADN genómico en un rango lineal de respuesta se utilizó entonces para estimar la cantidad relativa de cada familia en el genoma de *C. capillaris*.

3.7. SECUENCIACION Y ANALISIS DE LAS SECUENCIAS

Para la secuenciación, los plásmidos pCc21, pCcE9, pCcD29 y pCcH32 se amplificaron en *E. coli* y se purificaron mediante el sistema "Minipreps DNA purification system" (Promega). La secuenciación se realizó según el método enzimático de Sanger *et al.* (1977). Las dos cadenas de los plásmidos pCcE9 y pCcD29 se secuenciaron utilizando el kit de secuenciación "Sequenase Version II" (USB) con 35S-ATP y los "primers" universal y reverso. Para la secuenciación de los plásmidos

pCc21 y pCCH32 se utilizaron "primers" fluorescentes y el secuenciador automático "laser fluorescent ALF DNA sequencer" de Pharmacia, y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las secuencias del ADN repetido de los plásmidos pCcE9, pCcD29 y pCCH32 se han depositado en la Base de datos EMBL bajo los números Z12129, Z12130 y Z12131, respectivamente.

Para el alineamiento y comparación de las secuencias de cada uno de los tres ADNs satélites clonados en este trabajo se utilizó el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970). La búsqueda de homología de nuestras secuencias con otras presentes en la Base de datos de la EMBL se realizó con el programa FASTA (Pearson y Lipman, 1988).

3.8. TECNICAS CITOGENETICAS

3.8.1. ANALISIS DEL CARIOTIPO

La determinación del número de cromosomas Bs en cada una de las plantas analizadas a nivel molecular se realizó en los meristemos apicales de las raíces previamente tratados con colchicina (ver apartado 3.1). Para ello, las raíces se trataron con ClH 1N a 60°C durante 5 min y se tiñeron en una solución de orceína acética al 2% durante aproximadamente 2 horas. Tras la tinción, los meristemos se aplastaron sobre un portaobjetos con una gota de ácido acético.

3.8.2. OBTENCION DE PREPARACIONES CROMOSOMICAS. TECNICA DE BANDEO C.

Para el análisis cromosómico mediante bandeo C e hibridación *in situ*, se obtuvieron preparaciones cromosómicas de mitosis a partir de semillas germinadas de *C. capillaris* siguiendo el método descrito por Schwarzacher *et al.* (1980). Para las preparaciones de meiosis se

siguió el mismo método pero partiendo de flores inmaduras de *C. capillaris* previamente fijadas en etanol:ácido acético (3:1).

El análisis de la heterocromatina constitutiva o bandas C de *C. capillaris* se llevó a cabo siguiendo la técnica propuesta por Schwarzacher *et al.*, (1980).

3.8.3. HIBRIDACION IN SITU

A) MARCAJE DE LAS SONDAS

Los fragmentos de ADN utilizados como sonda se purificaron de la misma forma que para su utilización en hibridaciones en Southern-blots (apartado 3.5.3). Para el marcaje de las sondas utilizadas para hibridación *in situ* se utilizaron dos procedimientos. En algunos casos, las sondas se marcaron con biotina-dATP mediante "nick translation" utilizando el kit "Nick translation system" de BRL y siguiendo las instrucciones del fabricante. Otras se marcaron con digoxigenina-dUTP siguiendo las recomendaciones del kit de "random primed" de Boehringer-Mannheim. En ambos casos y tras la reacción de marcaje, el ADN se purificó de los nucleótidos no incorporados mediante precipitación con etanol.

B) HIBRIDACION

Las hibridaciones se realizaron siguiendo el método de Leitch *et al* (1991) con algunas modificaciones.

1) Las preparaciones cromosómicas se trataron con ARNasa a 100 µg/ml en 2 X SSC a 37°C durante 1 hora y se lavaron tres veces en 2 X SSC a temperatura ambiente durante 5 min.

2) Las preparaciones se incubaron en 70% de formamida a 70°C durante 2 min para desnaturalizar el ADN cromosómico, y se

deshidrataron rápidamente sumergiendo los portaobjetos en etanol al 70% a -20°C durante 5 min y en etanol absoluto en las mismas condiciones anteriores. Finalmente los portas se secaron a temperatura ambiente.

3) La solución de hibridación conteniendo 50% de formamida, 20% de sulfato de dextrano, 2 X SSC, 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de esperma de salmón y 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de sonda, se desnaturalizó en agua hirviendo durante 10 min y se dejó enfriar durante al menos 5 min en hielo. Cada una de las preparaciones cromosómicas se incubó con 20 μl de solución de hibridación a 37°C durante una noche en una cámara húmeda. Alternativamente, en algunos experimentos el ADN cromosómico y la sonda se desnaturalizaron al mismo tiempo. Para ello, las preparaciones cromosómicas conteniendo la solución de hibridación se cubrieron con un cubreobjetos, se sellaron con pegamento y se incubaron en una placa a 78°C durante 15 min. Tras la desnaturalización las preparaciones se incubaron en una cámara húmeda a 37°C durante una noche.

En ciertos casos fue necesario variar sensiblemente las condiciones de hibridación:

- En las hibridaciones *in situ* con ADN genómico (GISH), la concentración de la sonda en la solución de hibridación fue de 10 $\mu\text{g/ml}$. Cuando se utilizó ADN de *C. capillaris* sin Bs o de otras especies de *Crepis* como bloqueante, éste se rompió hasta fragmentos de aproximadamente 200 pb autoclavándolo durante 5 min, y se incluyó en la solución de hibridación a una concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$ (Schwarzacher *et al.*, 1989).

- Las hibridaciones con el fragmento de ADN telomérico del clon pAtT4 se llevaron a cabo en una solución de hibridación conteniendo formamida al 40% en lugar de al 50%.

C) LAVADO DE LAS PREPARACIONES Y DETECCION DE LOS SITIOS DE HIBRIDACION

Tras la hibridación, los portaobjetos se lavaron siguiendo las recomendaciones de Leitch *et al.* (1991). Tras eliminar el cubreobjetos, los portaobjetos se lavaron en una solución de formamida al 50% y 2 X SSC a 40°C durante 10 min. Posteriormente, las preparaciones se lavaron dos veces en 2 X SSC a 37°C durante 5 min y dos veces mas en 2 X SSC a temperatura ambiente durante 5 min.

En el presente trabajo, los sitios de hibridación *in situ* se han detectado de dos formas diferentes. En algunos casos la hibridación se detectó con el uso de un sistema enzimático que da lugar a una reacción colorimétrica en los sitios de hibridación y, en otros, la sonda se detectó mediante un sistema de fluorocromos. Las sondas marcadas con biotina se detectaron mediante estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina o mediante avidina conjugada con "Texas-red", y las sondas marcadas con digoxigenina se detectaron con antidigoxigenina conjugada con FITC.

1. Detección de las sondas marcadas con biotina mediante estreptavidina-fosfatasa alcalina

La detección de las sondas marcadas con biotina con estreptavidina-fosfatasa alcalina se llevó a cabo siguiendo el protocolo propuesto por Simpson *et al.* (1988) con ciertas modificaciones. Los portas se lavaron en tampón TMN (Tris-ClH 0.1M pH 7.5, NaCl 0.1M, MgCl₂ 2 mM, tritón X-100 al 0.05%) durante 15 min y se incubaron en una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 3% en tampón TMN. Después de lavar de nuevo en TMN durante 5 min las preparaciones se incubaron con 50 µl de estreptavidina-fosfatasa alcalina (BRL) diluida 1:100 en tampón TMN con 3% de BSA. Los portas se lavaron de nuevo en TMN durante 15 min y dos veces en el tampón de reacción (Tris-ClH 0.1M pH 9.5, NaCl 0.1M, MgCl₂ 50 mM) durante 5 min.

Posteriormente, las preparaciones se cubrieron con 500 μ l de solución de sustrato conteniendo 3.3 μ l de BCIP (BRL) y 4.4 μ l de NBT (BRL) por ml de tampón de reacción y se incubaron en una cámara húmeda a 37°C durante 30 a 60 min. Finalmente, las preparaciones se lavaron con Tris-ClH 0.1M pH 7.5 y los cromosomas se tiñeron con Giemsa al 2% en tampón fosfato pH 6.8.

2. Detección de las sondas marcadas con biotina o digoxigenina mediante los fluorocromos "Texas-red" ó FITC

La detección de la biotina mediante "Texas-red" se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Leitch *et al.* (1991). Las preparaciones se lavaron en 4 X SSC/Tween 20 al 0.2% durante 5 min, se incubaron con BSA al 5% en 4 X SSC/Tween durante 5 min a temperatura ambiente. Entonces, los portas fueron incubados con 50 μ l de avidina-"Texas-red" (Vector) a una dilución 1:500 en 4 X SSC/Tween/BSA a 37°C durante una hora en una cámara húmeda y posteriormente lavados 3 X 5 min en 4 X SSC/Tween a 37°C. Las señales de detección se amplificaron entonces mediante biotina-antiavidina (Vector). Los portas se bloquearon con suero normal de cabra al 5% en 4 X SSC/Tween, se incubaron durante 1 hora a 37°C en una dilución 1:20 de biotina-antiavidina y se lavaron en las mismas condiciones anteriores. Tras incubar los portas de nuevo con avidina-Texas-red, éstos se lavaron en 4 X SSC/Tween en las condiciones ya descritas y se secaron a temperatura ambiente.

La detección de las sondas marcadas con digoxigenina se realizó en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente pero con el uso de antidigoxigenina-FITC (Boehringer-Mannheim) obtenida en oveja a una dilución 1:10. La señal de hibridación se amplificó con anticuerpos de conejo frente a inmunoglobulinas de oveja conjugados con FITC (Sigma) a la dilución 1:30.

En las hibridaciones con dos sondas diferentes, una de ellas se marcó con digoxigenina-dUTP y la otra con biotina-dATP. Tras la hibridación, la detección simultánea de ambas sondas se realizó en las condiciones anteriores pero incluyendo simultáneamente antidigoxigenina-FITC y avidina-Texas-red en las incubaciones (Leitch *et al.* 1991).

Tras la detección, los cromosomas se contratificaron con 2 µg/ml de DAPI en tampón McIlvaine (ácido cítrico 0.009 M, Na₂HPO₄·H₂O 0.08 M, MgCl₂ 2.5 mM) durante 10-30 min a temperatura ambiente. Los portas se lavaron con agua destilada y se montaron en una solución de Tris-ClH 0.1M pH 8, 1 mg/ml de p-fenilenediamina y 90% de glicerol.

Las señales de hibridación detectadas mediante fluorocromos se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Zeiss con el uso de los juegos de filtros de epifluorescencia adecuados para FITC (código 09), "Texas-red" (código 12), y para DAPI (código 02). Para la visualización simultánea de las señales detectadas con FITC y "Texas-red" en las hibridaciones con dos sondas se utilizó el jugo de filtros de paso de banda doble FITC/Rodamina/Texas-Red de Zeiss.

4

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. EXPERIENCIAS PARA DETECTAR ADN ESPECIFICO DE LOS CROMOSOMAS Bs DE Crepis capillaris

Puesto que los cromosomas Bs se encuentran siempre ligados al complemento estándar de la especie que los porta, se hace bastante difícil poder aislar y analizar el ADN que forma parte de los cromosomas supernumerarios. No obstante, y puesto que éstos se encuentran en las poblaciones naturales en forma de polimorfismos, sí es posible obtener por separado ADN de individuos sin Bs y ADN de individuos con Bs. La identificación de plantas sin cromosomas Bs y plantas con distinto número de Bs se ha llevado a cabo en los meristemas apicales de raíces previamente tratadas con colchicina. Detectamos así plantas sin cromosomas Bs y plantas con 1 y 2 Bs.

Como puede observarse en la Fig. 1A, *C. capillaris* ($2n=6$) posee un cariotipo bastante asimétrico con una pareja de cromosomas submetacéntricos (1), una pareja de cromosomas subtelocéntricos (2) y una de cromosomas telocéntricos (3). Los cromosomas Bs de esta especie son metacéntricos y mas pequeños que el resto de cromosomas. Por tanto, las tres parejas cromosómicas y los cromosomas Bs son fácilmente identificables por su morfología. Cada uno de los cromosomas muestra también un patrón de bandas C característico (Fig. 1B). El primer par cromosómico posee una banda C terminal en el brazo corto, la segunda pareja muestra una pequeña banda heterocromática en los extremos de cada brazo cromosómico y una banda intersticial en el brazo largo, y la pareja tercera o cromosoma NOR muestra una región heterocromática asociada con el NOR en el brazo corto, una pequeña banda C centromérica y dos bandas heterocromáticas en el brazo largo. Sin tener en cuenta la heterocromatina asociada al NOR, las bandas C del cariotipo de *C. capillaris* representan aproximadamente un 13% del genoma haploide de la especie. Los cromosomas Bs se caracterizan por

un bloque de heterocromatina constitutiva localizado alrededor del centrómero (Fig. 1B).

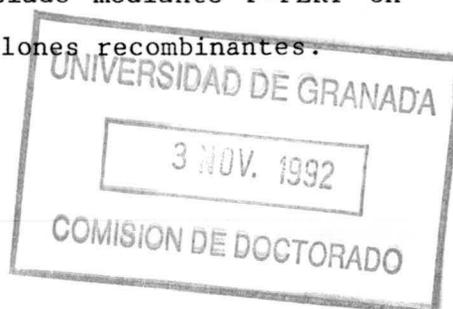
Con el fin de identificar y aislar secuencias específicas del ADN de los cromosomas Bs de *Crepis capillaris* se llevaron a cabo dos metodologías. En primer lugar y con el objetivo de identificar ADN repetido específico de los Bs, se analizaron los patrones de bandas de ADN repetido obtenidos tras digerir el ADN de plantas con cromosomas Bs y plantas sin Bs con diferentes enzimas de restricción y separar el mismo en geles de agarosa. En segundo lugar, se utilizó la técnica F-PERT en una hibridación sustractiva entre el ADN de plantas con y sin Bs con el propósito de clonar secuencias específicas de estos cromosomas.

4.1.1 ANALISIS DEL ADN REPETIDO DE PLANTAS CON Y SIN CROMOSOMAS Bs

Con el fin de identificar secuencias de ADN repetido específicas de los cromosomas Bs de *C. capillaris*, el ADN de plantas sin cromosomas Bs y el ADN de plantas con 2 Bs fue digerido con un total de 18 enzimas de restricción (Dra I, Eco RI, Xba I, Bam HI, Pvu II, Hind III, Mbo I, Hae III, Rsa I, Alu I, Hpa II, Msp I, Nde I, Hind II, Sac I, Hinf I, Sau 3A y Dde I). Tras separar los fragmentos de restricción resultantes en geles de agarosa y teñir el ADN con bromuro de etidio, se observó que la mayor parte de las digestiones originaban un patrón característico de bandas de restricción que se corresponden con ADN repetido (Fig. 2). Sin embargo, tanto el ADN de plantas sin cromosomas Bs como el ADN de plantas con Bs mostraron siempre el mismo patrón de bandas en todas las digestiones, no apareciendo ninguna banda específica que correspondiera al ADN repetido de los cromosomas Bs (Fig. 2).

4.1.2. HIBRIDACION SUSTRACTIVA ENTRE ADN DE PLANTAS CON Y SIN CROMOSOMAS Bs MEDIANTE LA TECNICA F-PERT

Los datos descritos anteriormente indicarían que el ADN repetido que puede existir en los cromosomas Bs es muy similar al que se encuentra en los cromosomas estándar. No obstante podía ocurrir que no hubiésemos utilizado la enzima de restricción idónea para detectar el ADN repetido específico de los cromosomas Bs. Nos propusimos entonces analizar el ADN de los cromosomas Bs mediante la técnica de reasociación de ADN en presencia de fenol y formamida (F-PERT), que permite clonar fragmentos de ADN presentes en ciertos individuos pero no en otros. El método conlleva una reasociación competitiva del ADN de ambos tipos de individuos y la subsiguiente clonación de las moléculas que hayan reasociado adecuadamente. Para ello, 1 μ g de ADN de un individuo con 2 cromosomas Bs se digirió con Mbo I y se mezcló con 200 μ g de ADN de un individuo sin Bs, previamente dividido en fragmentos de aproximadamente 600 pb mediante sonicación. La mezcla de ADN se desnaturizó por calor y se dejó renaturalizar durante 48 horas en presencia de fenol y formamida. Tras la renaturalización cabe esperar tres tipos de fragmentos de ADN en cuanto a sus extremos: la mayor parte de los fragmentos reasociados contendrán extremos rotos, otra fracción estará formada por fragmentos híbridos en los cuales una de las hebras tendrá extremos rotos mientras que la otra tendrá extremos Mbo I, y la fracción menos frecuente estaría formada por fragmentos con dos extremos Mbo I (Kohne *et al.*, 1977). Puesto que las secuencias específicas que formen parte de los cromosomas Bs solo pueden reasociar entre sí, éstas originarían fragmentos cuyos dos extremos serían Mbo I. Teniendo en cuenta que esta última fracción es la única que puede ser ligada a los extremos Bam HI de un vector, se espera que la mayor parte de los clones recombinantes que surjan de la clonación del ADN reasociado contengan secuencias específicas de estos cromosomas. Tras ligar 10 μ g del ADN reasociado mediante F-PERT en pUC19 y transformar en *E. coli* obtuvimos 105 clones recombinantes.



Para detectar la presencia de ADN altamente repetido específico de cromosomas Bs en alguno de los clones, el ADN plasmídico de cada uno de ellos se desnaturalizó, se fijó a una membrana de nylon mediante dot-blot y se hibridó por separado con ADN genómico marcado de individuos con cromosomas Bs y ADN de individuos sin cromosomas Bs. Sin embargo, ninguno de los clones mostró una hibridación más intensa con el ADN de plantas con 2 Bs. Esto indicaba que ninguno de los clones recombinantes era portador de secuencias repetidas específicas de los cromosomas Bs, ya sea porque el ADN altamente repetido que puedan tener estos cromosomas es bastante similar al que presentan los cromosomas estándar o bien porque los cromosomas Bs de esta especie carecen de ADN altamente repetido. De igual forma, el patrón de hibridación en Southern-blot que mostró el ADN de plantas con Bs y ADN de plantas sin Bs, cuando se hibridó con el ADN de cada uno de estos clones, fue similar.

No obstante, uno de los clones (pCc21) originaba ciertas bandas de hibridación adicionales con el ADN de individuos con cromosomas Bs (Fig. 3). Puesto que se han analizado 16 individuos (8 con Bs y 8 sin Bs) y los fragmentos de restricción adicionales únicamente aparecieron en el ADN de plantas con Bs, es de suponer que éstos fragmentos de restricción surgen de la digestión del ADN de los Bs y no como consecuencia de un polimorfismo interindividual. Por tanto, la secuencia presente en pCc21 debe localizarse tanto en los cromosomas As como en los Bs. Cabe señalar que aunque ciertas enzimas de restricción tales como Eco RI o Sac I originaban fragmentos de restricción específicos de cromosomas Bs al hibridar con pCc21, otras enzimas como Hind III o Dra I no lo hacían (Fig 3). Por tanto, el hecho de no encontrar diferencias entre el ADN de plantas con Bs y ADN de plantas sin Bs con el resto de los clones, puede deberse a que no se haya utilizado la enzima de restricción idónea para detectar RFLPs entre ambos tipos de individuos como en el caso de pCc21, o porque la homología entre el ADN presente en el cromosoma B y en los cromosomas As sea muy elevada.

El plásmido pCc21 contiene un inserto de 58 pb rico en dinucleótidos CA (GATCTAACACACGCGAGTACACACACACAAACACACAGACACACATAGAAAACGT). La comparación de esta secuencia con las presentes en la bases de datos de EMBL puso de manifiesto una gran homología con otras regiones ricas en CA de gran número de genes animales y vegetales.

El patrón de hibridación de pCc21 sobre ADN genómico de *C. capillaris* digerido con enzimas de restricción y transferido a un soporte sólido mediante Southern-blot es indicativo de que las regiones ricas en dinucleótidos CA que muestran homología con pCc21 se distribuyen de forma dispersa en el genoma de esta especie. De hecho, tras digerir el ADN total de esta especie con las enzimas Eco RI, Hind III, Dra I o Sac I e hibridar con pCc21, aparece un patrón de hibridación formado por fragmentos de distinto tamaño a lo largo de toda la línea del recorrido del ADN (Fig. 3). Además, todas las digestiones mostraron ciertas bandas de hibridación concretas, mucho más intensas, que diferían en tamaño de unas digestiones a otras (Fig. 3). Puesto que estas enzimas no poseen ninguna diana dentro del inserto de pCc21, este patrón de digestión indica que las regiones homólogas a la secuencia clonada están dispersas en distintos sitios del genoma y con diferente número de copias en cada sitio. El patrón de hibridación que mostraba pCc21 sobre ADN genómico de plantas con y sin Bs digerido con Mbo I (enzima utilizada para generar el inserto clonado en pCc21) era similar aunque, comparado con los patrones de hibridación obtenidos tras digerir el ADN con otras enzimas, éste era mucho menos intenso siendo, además, los fragmentos de restricción mucho más pequeños (Fig. 3). En digestiones parciales con esta misma enzima se observa que a medida que aumenta el tiempo de digestión, las bandas de hibridación son de menor tamaño a la vez que se pierde intensidad en la hibridación (Fig. 3). Esto sugiere que las regiones formadas por dinucleótidos CA dentro del genoma de *C. capillaris* son bastante pequeñas, por lo que a medida que aumenta la digestión con Mbo I se originan fragmentos de restricción tan pequeños que se salen

del gel durante la electroforesis y no pueden ser detectados en la hibridación en Southern-blot.

4.2. ANALISIS DE SECUENCIAS DE ADN ALTAMENTE REPETIDO EN EL GENOMA ESTANDAR Y EN LOS CROMOSOMAS Bs DE Crepis capillaris.

Puesto que ninguno de los dos métodos descritos anteriormente fue capaz de detectar ADN repetido específico de los cromosomas Bs, y teniendo en cuenta que tanto los cromosomas estándar como los Bs de *C. capillaris* poseen bandas de heterocromatina constitutiva (Fig. 1B), era de esperar que al menos alguna de las secuencias de ADN altamente repetido presentes en los cromosomas estándar de esta especie también lo estuviesen en la heterocromatina del cromosoma B. Nos propusimos, entonces, identificar y clonar secuencias de ADN altamente repetido del genoma estándar para posteriormente analizar su organización y distribución en los cromosomas A y B de esta especie.

Como hemos indicado anteriormente, la digestión del ADN genómico de *C. capillaris* con varias ERs, la separación de los fragmentos resultantes en un gel de agarosa y la tinción con bromuro de etidio da lugar a una serie de bandas discretas formadas por ADN repetido. En concreto, ciertas enzimas de restricción tales como Eco RI, Dra I o Hind III originaban bandas de bajo peso molecular que seguramente se corresponden con secuencias de ADN satélite (Fig. 2). Tras clonar el ADN presente en las bandas que originan cada una de estas tres enzimas de restricción, logramos identificar tres familias de ADN altamente repetido: la familia Eco RI, la familia Dra I y la familia Hind III.

4.2.1. LA FAMILIA ECO RI.

A) Identificación, aislamiento y clonación.

Tras digerir el ADN genómico de *C. capillaris* con Eco RI, fraccionarlo en un gel de agarosa y tefirlo con bromuro de etidio, se

observa una banda intensa de aproximadamente 360 pb (Fig. 2A). Con el fin de analizar el ADN repetido presente en esta banda, éste fue aislado del gel y ligado al sitio Eco RI del vector plasmídico pUC19. De entre los clones recombinantes obtenidos tras transformar el resultado de la ligación en *E. coli*, se seleccionó uno (pCcE9) que mostraba una hibridación intensa cuando se hibridaba tanto con ADN total de la especie como con el ADN marcado obtenido a partir de la misma banda que se utilizó para clonar.

B) Secuencia de nucleótidos.

La Fig. 4A muestra la secuencia nucleotídica del inserto de pCcE9, así como el mapa de restricción derivado de la misma. Se trata de una secuencia de 356 pb que muestra un contenido en G+C del 42%. La secuencia muestra ciertas regiones de homología interna: entre los nucleótidos 15 y 96 y 188 y 269 aparecen dos regiones con una homología del 76% (Figs. 4A y B). La secuencia muestra también pequeñas secuencias palindrómicas en las posiciones 37 a 47, 54 a 64 y 126 a 135, además de una secuencia invertida de 11 pb entre los nucleótidos 4 y 14, y 239 y 249 (Fig. 4A). La secuencia de pCcE9 no mostró ninguna homología significativa con otras secuencias de ADN repetido o único presentes en la base de datos de EMBL.

C) Determinación del número de copias y de su organización genómica.

La determinación de la proporción que esta familia de ADN repetido representa en el genoma de *C. capillaris* se llevó a cabo mediante una experiencia en la cual distintas cantidades de ADN plasmídico (pCcE9) y de ADN genómico de *C. capillaris* fueron inmovilizadas en una membrana de nylon, y posteriormente hibridadas con el inserto de este mismo plásmido previamente marcado con peroxidasa. Tras comparar las intensidades de la hibridación del plásmido y del ADN genómico mediante densitometría, se calculó que la familia Eco RI constituye aproximadamente un 3% del genoma haploide de

C. capillaris. Teniendo en cuenta que el genoma haploide de *C. capillaris* contiene 4.3 pg de ADN (Maluszynska, 1990), la secuencia de 356 pb que contiene pCcE9 estaría repetida aproximadamente 3.3×10^6 veces por genoma haploide.

El estudio de la organización de esta familia de ADN repetido en el genoma de *C. capillaris* se llevó a cabo mediante Southern-blot. Para ello, el ADN de esta especie fue digerido con diferentes enzimas de restricción, fraccionado en un gel de agarosa y transferido a una membrana de nylon. Tras hibridar con el inserto del plásmido pCcE9 aparecía un patrón de hibridación en escalera en el que cada peldaño era múltiplo de unidades de aproximadamente 360 pb (Fig. 5). Este patrón de hibridación indica que las unidades de 360 pb que constituyen la familia Eco RI se organizan en tándem en el genoma de *C. capillaris*. Las digestiones de ADN total están de acuerdo con el mapa de restricción obtenido a partir de la secuencia de pCcE9 (Fig. 4A). Así, las enzimas Eco RI, Alu I, Hinf I y Rsa I, las cuales disponen de una o dos dianas de restricción en el monómero de pCcE9, son capaces de cortar el ADN satélite hasta multímeros de bajo peso molecular (patrón de digestión tipo A) (Fig. 5). Por el contrario, las enzimas Dra I, Hae III, Nde I, Sac I y Sal I, para las cuales no existen dianas dentro de la secuencia de pCcE9, apenas digieren el ADN satélite, el cual permanece como ADN de alto peso molecular sin digerir o como multímeros de alto peso molecular (Fig. 5).

Con el fin de investigar el grado de metilación presente en esta familia, el ADN celular de *C. capillaris* fue también digerido con los isoesquizómeros Msp I y Hpa II. Estas dos enzimas reconocen la misma diana de restricción 5'-CCGG-3'. Sin embargo, Hpa II no es capaz de cortar cuando la C interna de la diana se encuentra metilada y Msp I no corta cuando la C del extremo 5' está metilada (Sambrook *et al.*, 1989). Cuando el ADN genómico cortado con estas enzimas es hibridado con el inserto de pCcE9, las digestiones de Msp I muestran un patrón en escalera formado por fragmentos de aproximadamente 180 pb, en lugar

de 360 pb como ocurría con las demás enzimas (Fig. 5). Esta observación está de acuerdo con la secuencia nucleotídica de pCce9, la cual muestra dos dianas equidistantes para Msp I (Fig. 4A). El patrón en escalera puede ser debido o bien a variaciones en la secuencia entre las distintas unidades, de forma que se pierdan una o ambas dianas de restricción para MspI, o a la presencia de 5'metil-C en algunas dianas MspI/HpaII del satélite. Sin embargo, el satélite Eco RI es totalmente resistente a la digestión con Hpa II incluso a una concentración elevada de enzima (Fig. 5). Esta última observación indica que las citosinas internas de ambas dianas de restricción se encuentran metiladas en todos los miembros de la familia.

El patrón de hibridación que muestra pCce9 sobre el ADN de plantas con cromosomas Bs digerido con diferentes enzimas de restricción fué similar al que muestra el ADN de plantas sin Bs, no apareciendo ninguna banda de restricción adicional en el ADN de individuos con Bs.

D) Hibridación *in situ*

La localización de la familia Eco RI en los cromosomas de *C. capillaris* se llevó a cabo mediante hibridación *in situ*. Para ello, el inserto de pCce9 fue marcado con biotina-dATP mediante "nick translation" y utilizado para hibridar preparaciones cromosómicas de esta especie. Se observó así que esta familia se localiza en tres bandas de heterocromatina constitutiva: sobre una banda C terminal presente en el brazo corto del primer par cromosómico y sobre dos bandas intersticiales en cada uno de los brazos largos del segundo y tercer par de cromosomas (Fig. 6B). El cromosoma B, sin embargo, no mostraba ningún signo de hibridación (Fig. 6B).

4.2.2. LA FAMILIA DRA I.

A) Identificación, aislamiento y clonación

Al digerir el ADN total de *C. capillaris* con Dra I, fraccionarlo en un gel de agarosa y teñirlo con bromuro de etidio aparecía una banda intensa de aproximadamente 260 pb. El ADN de esta banda fue extraído de la agarosa y clonado en el sitio Hind II de pUC19. De entre los clones recombinantes obtenidos se seleccionó uno (pCcD29) que hibridaba fuertemente con el ADN marcado obtenido a partir de la misma banda de 260 pb.

B) Secuencia de nucleótidos

La secuencia del inserto de pCcD29 se muestra en la Fig. 7A. Se trata de una secuencia de 259 pb cuyo contenido en G+C es del 42.7%. La secuencia muestra ciertas regiones palindrómicas entre los nucleótidos 23 y 36, 55 y 65 y 145 y 156 (Fig. 7A) pero, al contrario que pCcE9, no muestra ninguna repetición interna. El alineamiento de las secuencias de pCcE9 y pCcD29 puso de manifiesto una región de homología entre ambos elementos. En concreto, existe una región de 37 pb en pCcD29 que muestra un 67.5% de homología con parte de una de las dos repeticiones directas encontradas en pCcE9 (Fig. 7B). La búsqueda de homología de esta secuencia con otras presentes en la base de datos de EMBL no dió ningún resultado significativo.

C) Determinación del número de copias y de su organización genómica

La determinación de la proporción que esta secuencia representa en el genoma de *C. capillaris* se realizó de la misma forma que para pCcE9, encontrando que el 7% del genoma haploide de esta especie está formado por secuencias relacionadas con pCcD29. Esto supone unas 10^7 copias de la secuencia de 259 pb de pCcD29 en el genoma haploide de *C. capillaris*.

La organización de la familia Dra I es igual que la de la familia Eco RI anteriormente descrita: la unidad de repetición de 260 pb se repite en tándem formando largos clusters de ADN satélite. El patrón en escalera obtenido tras hibridar pCcD29 con el ADN genómico de *C. capillaris* cortado con enzimas de restricción es indicativo de este tipo de organización (Fig. 8). No obstante, la variación en los sitios de restricción que muestran los miembros de esta familia es mayor que la mostrada por la familia Eco RI. De hecho, la mayor parte de las enzimas de restricción utilizadas producen un patrón multimérico que va desde el monómero de 260 pb a multímeros de alto peso molecular (Fig. 8). Este patrón de hibridación es indicativo de una alta variación para las dianas de restricción de las enzimas utilizadas entre las unidades del satélite. De igual forma, en las digestiones originadas por Rsa I, Hae III y Hinf I superpuesta a la escalera formada por fragmentos múltiples de 260 pb aparece una escalera más débil formada por fragmentos de tamaño diferente (Fig. 8). Además, ciertas enzimas como Dra I y Alu I aunque digieren la mayor parte del ADN, no lo hacen totalmente (Fig. 8). Esta última observación indica que las unidades que presentan estas variaciones (la pérdida de las dianas de restricción Dra I o Alu I en este caso) no se encuentran distribuidas al azar a lo largo del satélite sino que se organizan en tándem en una región concreta del mismo. Estas variaciones no se deben en ningún caso a la presencia de cromosomas Bs ya que pCcD29 mostraba siempre el mismo patrón de hibridación tanto con el ADN de plantas sin Bs como con el ADN de plantas con Bs.

Las digestión de esta familia con los isoesquizómeros Msp I y Hpa II indicaba que, aunque existen pocas dianas para estas enzimas en dicha familia, no obstante, Msp I detectaba ciertos sitios de restricción dentro del satélite dando lugar a multímeros de alto peso molecular mientras que el satélite era totalmente resistente a la digestión con Hpa II (Fig. 8). Esto indica que las citosinas internas de las pocas dianas 5'-CCGG-3' presentes en esta familia se encuentran metiladas.

D) Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* de pCCD29 sobre los cromosomas de *C. capillaris* demostró de nuevo que dicha familia formaba parte de la heterocromatina constitutiva de la especie. De hecho, la familia Dra I se localizaba en todas las bandas C que forman parte del cariotipo de esta especie, excepto en las asociadas al NOR (Fig. 6C). Los cromosomas Bs no hibridaron tampoco con pCcD29 (Fig. 6C).

4.2.3. POSICION RELATIVA DE LAS FAMILIAS ECO RI Y DRA I EN LOS CROMOSOMAS Y NUCLEOS MITOTICOS Y MEIOTICOS DE *C. capillaris*

Con el fin de determinar la disposición de las familias Eco RI y Dra I en aquellas bandas C donde la hibridación de ambas familias coincide, llevamos a cabo un experimento de hibridación simultánea con ambas sondas (pCcE9 y pCcD29). Durante la metafase mitótica, la condensación de los cromosomas impide que los signos de hibridación que muestran cada una de las familias Dra I y Eco RI se observen separados. Sin embargo, en los núcleos interfásicos y profásicos se observa que ambas familias se localizaban en sitios diferentes (Fig. 6C), lo que indicaba que estas dos familias, aunque próximas en su localización cromosómica, se organizan en clusters separados dentro de cada banda C. La disposición de las dos familias de ADN repetido en la heterocromatina de cada cromosoma se muestra en la figura 6E. Como puede observarse, la familia Eco RI tiene una posición más próxima al centrómero que la familia Dra I.

Durante la interfase mitótica, los distintos clusters de ambas familias forman diferentes cromocentros que no llegan a asociarse (Fig. 9A-C). Sin embargo la hibridación simultánea de pCcE9 y pCcD29 sobre preparaciones de células madres del polen ha puesto de manifiesto que, durante la primera profase meiótica (Fig. 9D-F), los cromocentros de la familia Eco RI se asocian formando un único bloque (Fig. 9E) en aproximadamente un 60% de las células analizadas (110),

mientras que los cromocentros de la familia Dra I permanecen dispersos en el mismo núcleo (Fig. 9F), no llegando a asociarse en ningún otro estadio de la primera profase meiótica.

4.2.4. LA FAMILIA HIND III

A) Identificación, aislamiento y clonación

Tras digerir el ADN total de *C. capillaris* con Hind III, fraccionarlo en agarosa y teñirlo con bromuro de etidio aparece una banda prominente de aproximadamente 160 pb. El ADN presente en esta banda fue aislado y ligado al sitio Hind III del vector pUC19. Tras transformar la mezcla de ligación en *E. coli*, las bacterias recombinantes portadoras del fragmento de ADN repetido se seleccionaron tras hibridar con el ADN obtenido a partir de la misma banda que se usó para clonar. Seleccionamos, así, un clon (pCch32) para experimentos sucesivos.

B) Secuencia de nucleótidos

La secuencia del inserto de pCch32 se muestra en la Fig. 10A. El plásmido contiene un inserto de 159 pb cuyo contenido en G+C es del 40%. La secuencia muestra dos subrepeticiones directas entre los nucleótidos 60 y 74 y 96 y 110 con un 80% de homología, y dos repeticiones inversas entre los nucleótidos 114 y 125 y 147 y 159 con una homología del 85% (Fig. 10B). El alineamiento de esta secuencia con las otras dos secuencias de ADN repetido descritas anteriormente puso de manifiesto la presencia de una región de homología con el inserto de pCce9: ambos elementos mostraron un 68.7% de homología entre dos regiones de 32 pb (Fig. 10C). En pCch32 esta región se encuentra a ambos lados de la secuencia pero, asumiendo que los elementos de la familia Hind III se organizan en tándem (ver más adelante), el final de una unidad estaría adyacente con el principio de la siguiente.

C) Determinación del número de copias y de su organización genómica

La proporción que esta familia de ADN repetido supone en el genoma de *C. capillaris* es de aproximadamente un 1.5%. Esto supone unas 3.6×10^5 copias de la unidad básica de repetición de 159 pb en cada genoma haploide.

Al igual que los dos ADN satélites descritos anteriormente, las unidades repetidas que forman parte de la familia Hind III se organizan en tándem en largos clusters. De hecho, el patrón de hibridación en Southern-blot de pCCH32 con ADN genómico de *C. capillaris* digerido con distintas enzimas de restricción (Fig. 11) es indicativo de este tipo de organización. Las digestiones del ADN satélite definido por Hind III están de acuerdo con el mapa de restricción obtenido a partir de la secuencia de pCCH32 (Fig. 10A). Así, Hind III y Alu I, para las cuales existe una diana de restricción dentro de pCCH32, cortan prácticamente en todas las unidades de repetición originando una banda que se corresponde al monómero de 160 pb, así como las correspondientes al dímero y al trímero (Fig. 11A). Sin embargo, las enzimas que carecen de dianas dentro de la unidad de pCCH32 mostraron dos patrones diferentes de digestión: en las digestiones con Dra I, Hinf I, Hae III y Rsa I, aunque la mayor parte del satélite no se digería, aparecían una serie de bandas múltiplos de la unidad de repetición básica (Fig. 11A). En cambio, las digestiones con Eco RI mostraron una serie de bandas cuyos pesos moleculares no eran múltiplos del monómero de 160 pb. Estos fragmentos generados por Eco RI eran, además, distintos entre diferentes individuos de *C. capillaris* (Fig. 11A). Este polimorfismo era independiente de la presencia o no de cromosomas Bs en los individuos analizados (Fig. 11B). En el resto de las digestiones, la hibridación en Southern-blot de pCCH32 sobre el ADN de plantas con Bs era también similar al que mostraba el ADN de plantas sin Bs.

D) Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* de pCCH32 sobre los cromosomas de *C. capillaris*, mostró una localización mas restringida que en el caso de los dos ADNs satélites descritos anteriormente. En concreto, esta familia se localiza sobre una pequeña banda paracentromérica presente en el cromosoma NOR de esta especie, así como en el brazo largo de este mismo par cromosómico (Fig. 12). Ninguna región del cromosoma B hibridó tampoco con pCCH32 (Fig. 12A). La hibridación de pCCH32 sobre núcleos interfásicos y profásicos demostraba que tanto las dos bandas paracentroméricas como el brazo largo de cada uno de los homólogos de la pareja NOR tienden a estar muy próximos (Fig. 12C). Esta asociación entre los dos cromosomas NOR homólogos se ha observado en aproximadamente el 50% de las 150 células analizadas.

4.2.5. DISTRIBUCION DE LAS FAMILIAS ECO RI, DRA I Y HIND III EN EL GENOMA DE OTRAS ESPECIES DEL GENERO CREPIS

La posible distribución de las Familias de ADN repetido Eco RI, Dra I y Hind III en el genoma de otras especies del género *Crepis*, se realizó mediante Southern-blot. Se analizaron seis especies de este género: *C. biennis*, *C. setosa*, *C. dioscoridis*, *C. rubra*, *C. foetida* y *C. zacintha*. El ADN de estas especies fue digerido con las enzimas de restricción Eco RI o Dra I, fraccionado mediante electroforesis en un gel de agarosa y transferido a una membrana de nylon. Al hibridar los filtros con el inserto de pCCE9 que contiene una unidad de repetición de la familia Eco RI o con el de pCCD29, que contiene una unidad de repetición de la familia Dra I, ninguna de las especies, excepto *C. capillaris*, mostraba hibridación, incluso en condiciones de baja astringencia. No obstante, cuando estos mismos filtros se utilizaron para hibridar con pCCH32, se observó que la familia Hind III estaba presente en el genoma de ciertas especies como *C. biennis*, *C. setosa* y *C. zacintha*, pero no en el resto de las especies analizadas (Fig. 13).

El monómero de la familia Hind III, pCch32, hibridaba con el genoma de estas especies incluso en las condiciones de astringencia más altas descritas en Material y Métodos. Al igual que en *C. capillaris*, en estas tres especies la familia Hind III está formada por unidades de aproximadamente 160 pb, las cuales se repiten en tándem dentro de cada genoma.

4.3. ANALISIS DEL ADN DE LOS CROMOSOMAS Bs DE Crepis capillaris MEDIANTE HIBRIDACION IN SITU CON ADN GENOMICO (GISH)

Con el fin de profundizar en el análisis molecular de los cromosomas Bs de *C. capillaris*, llevamos a cabo una serie de experimentos de hibridación *in situ* utilizando como sonda el ADN genómico de individuos con y sin cromosomas Bs.

En primer lugar, para comprobar si el ADN de los cromosomas estándar muestra homología con el ADN de cromosomas Bs, el ADN marcado de individuos sin Bs se utilizó para hibridar preparaciones cromosómicas con Bs. Como puede observarse en la Fig. 14, los cromosomas Bs muestran una hibridación similar que los As. No obstante, las regiones más grandes de heterocromatina constitutiva de los cromosomas As mostraban una hibridación más intensa con respecto a la eucromatina, hecho que no sucedía con la banda de heterocromatina constitutiva del cromosoma B. Esto indicaba que el ADN de los cromosomas Bs muestra un alto grado de homología con el ADN presente en los cromosomas As. Además, el hecho de que la heterocromatina de los Bs hibridara igual que lo hace la eucromatina podría indicar que esta región, aunque heterocromática, no es rica en ADN altamente repetido.

Cuando el ADN marcado de individuos con 2 cromosomas Bs se utilizó para hibridar *in situ* sobre preparaciones cromosómicas con Bs, los resultados fueron similares (Fig. 14). La región heterocromática

del cromosoma B no mostró tampoco una hibridación diferencial con respecto a la eucromatina, aunque las regiones heterocromáticas de los cromosomas As sí lo hacían. Los signos de hibridación se ven drásticamente reducidos si el ADN marcado de individuos con 2 Bs se mezcla con un exceso de ADN sin marcar de individuos sin Bs, y se utiliza para hibridar preparaciones cromosómicas de plantas con Bs. De alguna forma, el ADN de plantas sin Bs, que se añade en exceso, bloquea la hibridación del ADN marcado ya sea porque hibrida sobre los cromosomas o con el ADN marcado de plantas con Bs. Este resultado vuelve a indicar que el cromosoma B de *C. capillaris* no posee secuencias de ADN repetido específicas.

Con el fin de enriquecer la sonda en ADN repetido específico de *C. capillaris*, el ADN marcado de plantas con 2 Bs se mezcló con un exceso de ADN sin marcar de otras especies de *Crepis* (*C. rubra*, *C. setosa*) y se utilizó para hibridar *in situ*. En este caso, las secuencias repetidas específicas de *C. capillaris* no son bloqueadas por el ADN de las otras especies y, por tanto, podrían hibridar sobre los cromosomas de esta especie. Los resultados coinciden con los mostrados en la Fig. 14. Las regiones de heterocromatina constitutiva de los cromosomas As mostraron una fuerte hibridación. En cambio, la heterocromatina del B adquiere de nuevo la misma hibridación que la eucromatina.

4.4. ANALISIS DEL ADN RIBOSOMICO EN EL GENOMA ESTANDAR Y EN LOS CROMOSOMAS Bs DE *C. capillaris*

4.4.1. HIBRIDACION IN SITU

A) El ADN ribosómico 18S y 25S.

Aunque la mayor parte del ADN ribosómico 18S, 5.8S y 25S de *C. capillaris* se encuentra localizado en el brazo corto del tercer par cromosómico, Maluzynska y Schweizer (1989) han demostrado

recientemente que el cromosoma B de esta especie contiene ADN ribosómico en las proximidades de ambos telómeros.

En un intento global de analizar el cromosoma B de *C. capillaris* desde un punto de vista molecular, se hace necesario analizar los cistrones ribosómicos presentes en estos cromosomas y su relación con los que presenta el genoma estándar de la especie. En primer lugar, comprobamos si los cromosomas Bs del material que estábamos analizando tenían o no cistrones ribosómicos. La detección de ADN ribosómico en los cromosomas de *C. capillaris* se ha llevado a cabo utilizando el inserto de ADNr de pTA71. La Fig. 15A muestra la hibridación *in situ* de pTA71 con los cromosomas de *C. capillaris*. En ella se puede observar cómo el ADN ribosómico no solo hibrida con la región terminal del brazo corto del tercer par cromosómico sino también con la región terminal de cada uno de los brazos del cromosoma B. En el cromosoma 3 el ADNr de pTA71 hibrida tanto en la constricción secundaria como con el satélite heterocromático terminal asociado a la misma (Figs. 15A, D y F).

Puesto que se ha utilizado como sonda el ADN ribosómico de una especie evolutivamente distante de *C. capillaris*, es poco probable que la hibridación sobre los Bs se deba a las secuencias espaciadoras en el ADNr, ya que éstas varían mucho de unas especies a otras. Por tanto, la hibridación del ADNr sobre los cromosomas Bs de *C. capillaris* es debida a la presencia de verdaderos genes de ARN ribosómico 18S y 25S, y no a otro tipo de secuencias de ADN repetido relacionadas con el ADN ribosómico.

B) ADN ribosómico 5S

La hibridación *in situ* de ADN 5S en los cromosomas de *C. capillaris*, se llevó a cabo con la sonda heteróloga cP5S. La hibridación del inserto de cP5S sobre los cromosomas de *C. capillaris* se muestra en la Fig. 15B. El ADN ribosómico 5S se localiza sobre el

brazo corto del tercer par cromosómico, muy próximo a los genes ribosómicos que codifican para los ARNs ribosómicos 18S, 5.8S y 25S. El cromosoma B, sin embargo, no mostró ningún signo de hibridación con esta sonda.

La posición relativa del ADNr 18S y 25S con respecto a la del ADN 5S, se determinó mediante hibridación simultánea con las sondas pTA71 y cP5S. Ambos tipos de ADN ribosómico aunque próximos en su localización forman clusters separados. El ADNr que codifica para los ARNs ribosómicos 18S, 5.8S y 25S tiene una posición terminal en el brazo corto del cromosoma 3, mientras que el cluster de ADN 5S se localiza más próximo al centrómero en este mismo brazo cromosómico (Figs. 15D y F).

4.4.2. CARACTERIZACION MOLECULAR

La organización del ADN ribosómico en el genoma de *C. capillaris* se analizó mediante hibridación en Southern-blot. Para ello, el ADN de *C. capillaris* se digirió con diferentes enzimas de restricción y se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa. Después de transferir el ADN a una membrana de nylon, se hibridó con las sondas heterólogas pTA71 ó cP5S.

A) El ADN ribosómico 18S, 5.8S y 25S.

En *C. capillaris*, al igual que en otras especies animales y vegetales, el ADN que codifica para los ARNs ribosómicos 18S, 5.8S y 25S está formado por unidades repetidas que se organizan en tándem. La digestión del ADN de *C. capillaris* con las enzimas de restricción Eco RI, Dra I y Bam HI pone de manifiesto la existencia de variaciones intra e interindividuales para el tamaño de las unidades de repetición del ADNr. De hecho las digestiones de ADN con Dra I mostraron dos patrones diferentes de hibridación en Southern-blot. En algunos individuos la hibridación con pTA71 da lugar a dos bandas de

aproximadamente 5.1 Kb y 3.9 Kb, mientras que en otros individuos aparece una banda adicional de aproximadamente 3.7 Kb (Fig. 16A). De igual forma, la digestión con Eco RI del ADNr de ciertos individuos da lugar a dos fragmentos de restricción de 5.3 y 3.7 Kb, mientras que en otros individuos (que coinciden con los que muestran un fragmento de restricción adicional con Eco RI) aparece un fragmento extra de aproximadamente 5.1 Kb (Fig. 16B). Estos patrones de digestión indican que el ADNr de *C. capillaris* está formado por dos tipos de unidades repetidas: una de aproximadamente 9 y otra de 8.8 Kb, cada una de las cuales posee dos dianas de restricción para las enzimas Eco RI y Dra I (Fig. 17). De entre un total de 12 individuos analizados, 10 de ellos mostraban ambas unidades de repetición, mientras que el ADNr de los dos individuos restantes estaba formado únicamente por unidades de 9 Kb. Esto significa que la unidad de 9 Kb se encuentra representada en todos los individuos analizados existiendo un polimorfismo para las unidades de 8.8 Kb. Además, el hecho de que los fragmentos de restricción originados por las unidades de 9 Kb hibriden con la misma intensidad en todos los individuos analizados mientras que los que se originan a partir de las unidades de 8.8 Kb muestren una intensidad de hibridación que varía de unos individuos a otros (Fig. 16), demuestra que las unidades de 8.8 Kb aparecen de forma extra y en un número variable de copias entre distintos individuos.

En cambio, la digestión del ADNr con Bam H1 da lugar a un patrón de hibridación más complejo (Fig. 16C) que indica la existencia de una variación en la secuencia entre las unidades repetidas de un mismo individuo. Existen así unidades que poseen cuatro dianas de restricción para Bam H1 mientras que otras unidades sólo poseen tres dianas. Esto determina que en los individuos que tienen una única unidad de repetición de 9 Kb aparezcan cinco fragmentos de restricción de aproximadamente 4.7, 3.5, 2.8, 1.5 y 1.2 Kb siendo los fragmentos de 3.5 y 1.2 Kb el producto de la digestión del fragmento de 4.7 Kb en algunas unidades de la familia (Fig. 16C). En aquellos individuos donde además de las unidades de 9 Kb aparecen otras de 8.8 Kb la

digestión con Bam HI origina dos fragmentos de restricción adicionales de 3.3 y 4.5 Kb (Fig. 16C).

El mapa de restricción para la enzimas Eco RI, Dra I y Bam HI que se presenta en la Fig. 17 se ha obtenido a partir de digestiones dobles con Eco RI + Bam HI, Eco RI + Dra I y Bam HI + Dra I (Figs. 16D y E) La hibridación se llevó a cabo con el inserto completo de pTA71 (Fig. 16D) o con el fragmento de 3.6 Kb que se origina tras cortar pTA71 con Eco RI + Bam HI (Fig. 16E), el cual contiene parte de los genes 18S + 25S, pero no la región intergénica (Fig. 17). Puesto que la longitud y la secuencia de los ARNs 18S y 25S de plantas está muy conservada, la longitud de los genes 18S, 5.8S y 25S, así como la longitud de los espaciadores internos que se transcriben (ITS1 y ITS2) que aparecen en el mapa de restricción se han tomado del mapa de *Brassica* (Delseny *et al.*, 1990).

El grado de metilación del ADNr de *C. capillaris* se analizó digiriendo el ADN de la planta con los isoesquizómeros Msp I y Hpa II e hibridando con el ADNr de pTA71. Los resultados se muestran en la figura 16F. Msp I fué capaz de digerir el ADNr de esta especie dando lugar a muchos fragmentos de restricción de distinto tamaño, mientras que Hpa II apenas cortaba dentro de la familia multigénica, por lo que la mayor parte de ésta permanecía sin digerir. Estos resultados demuestran que la mayor parte de las citosinas internas de los sitios MspI/HpaII dentro de cada unidad de ADNr están metiladas. Además, el patrón de hibridación multimérico que origina Msp I podría también indicar que muchas de las citosinas externas de estos mismos sitios de reconocimiento también se encuentran metiladas.

B) Comparación entre el ADN ribosómico 18S y 25S en el genoma estándar y en los cromosomas Bs.

Teniendo en cuenta que los cromosomas Bs de esta especie contienen ADNr es posible pensar que el polimorfismo para las unidades de 8.8 Kb, así como las variaciones interindividuales para el número de copias de esta misma unidad de repetición, se podrían deber a la presencia o no de cromosomas Bs en los distintos individuos analizados. Puesto que se conocía el cariotipo de cada uno de los individuos hemos podido observar que la presencia de las unidades de 8.8 Kb no está correlacionada con la presencia de cromosomas Bs ya que individuos sin cromosomas Bs también eran portadores de dicha unidad de repetición (Figs. 16A-C). De igual forma, puesto que ciertos individuos sin cromosomas Bs o con un solo cromosoma B mostraban mayor número de copias de 8.8 Kb que otros con dos cromosomas Bs (Figs. 16A-C), las variaciones en el número de copias para esta unidad de menor tamaño tampoco dependía del número de cromosomas Bs en cada individuo. No obstante, todas las plantas portadoras de cromosomas Bs analizadas poseían los dos tipos de unidades de 9 y 8.8 Kb. Sólo dos de las plantas analizadas, que no tenían Bs, carecían de las unidades de 8.8 Kb. Estos datos demostraba que la longitud de las unidades de ADNr de los Bs de *C. capillaris* no muestra ninguna diferenciación con respecto a la que aparece en el genoma estándar de la especie.

Por otro lado, y con el fin de analizar más exhaustivamente la relación entre la secuencia del ADNr de los cromosomas Bs y del genoma estándar de esta especie, el ADN de individuos sin cromosomas Bs y con dos cromosomas Bs se digirió con un total de 16 enzimas de restricción (Eco RI, Dra I, Bam HI, Hind III, Sac I, Pvu II, Hae III, Rsa I, Dde I, Sau3A, Mbo I, Alu I, Xba I, Nde I, Msp I and Hpa II), y se utilizó para hibridar en Southern-blot con el inserto de ADNr de pTA71. En la figura 16 se muestran algunas de estas hibridaciones. Ninguna de las enzimas de restricción utilizadas fué capaz de originar fragmentos de restricción específicos del ADNr de los cromosomas Bs, lo que indica

que las secuencias de las unidades de ADNr que forman parte de los cromosomas Bs deben ser muy similares a las de las unidades del genoma estándar.

C) El ADNr en otras especies de *Crepis*

La figura 18 muestra el análisis del ADNr de distintas especies del género *Crepis* (*C. capillaris*, *C. biennis*, *C. setosa*, *C. dioscoridis*, *C. rubra*, *C. foetida* y *C. zacintha*) mediante Southern-blot. El ADN de estas especies digerido con las enzimas Eco RI o Dra I fue separado mediante electroforesis en agarosa, transferido a una membrana de nylon e hibridado con la sonda de ADNr pTA71. Al igual que en *C. capillaris*, el ADNr de todas las especies de *Crepis* analizadas mostró dos dianas de restricción para Eco RI y Dra I. No obstante, cada especie mostraba un patrón de hibridación diferente, lo que indica que la longitud y/o la secuencia del ADNr varía entre las distintas especies. Así, *C. capillaris* y *C. biennis*, por ejemplo, mostraron los mismos fragmentos de restricción para Eco RI, lo que demuestra que las unidades repetidas de ambas especies tienen la misma longitud. Sin embargo, la digestión del ADNr de ambas especies con Dra I pone de manifiesto la presencia de fragmentos de restricción característicos en cada especie, lo que posiblemente se deba a una heterogeneidad en la secuencia de las unidades repetidas de ADNr entre distintas especies. Por tanto, al contrario de lo que ocurría entre el ADNr de los cromosomas As y el de los Bs de *C. capillaris*, el ADNr de las siete especies de *Crepis* analizadas puede diferenciarse perfectamente usando únicamente estas dos enzimas de restricción.

D) El ADN ribosómico 5S.

La organización de la familia multigénica que codifica para los ARNs 5S en el genoma de *C. capillaris*, se ha llevado a cabo mediante hibridación en Southern-blot. La Fig. 19 muestra la hibridación de cP5S con el ADN de *C. capillaris* digerido con distintas enzimas de

restricción y transferido a una membrana de nylon. Este patrón de hibridación es completamente diferente del mostrado por pTA71 para el ADN ribosómico 18S, 5.8S y 25S (Fig. 16), lo que indica que ambos ADNs ribosómicos, aunque se localizan muy próximos en el mismo par cromosómico (Fig. 15), están organizados en clusters separados.

Como puede observarse en la Fig. 19, el patrón de hibridación en escalera que muestra el ADN de *C. capillaris* con el cósmido cP5S indica que el ADN ribosómico 5S de esta especie está formado por unidades de aproximadamente 350 pb que se repiten en tándem formando largos clusters. De hecho, algunas enzimas tales como Eco RI, Dra I, Alu I, Hinf I, Sac I y Sal I, no reconocen ninguna diana dentro de las unidades repetidas del ADN 5S, por lo que la mayor parte del mismo permanece con la misma movilidad que el ADN sin digerir. Otras enzimas de restricción como Hae III y Rsa I cortan una sola vez dentro de la mayor parte de las unidades de ADN 5S originando una banda de aproximadamente 350 pb que se corresponde con el monómero, así como otras de mayor peso molecular que se corresponden con el dímero, el trímero o el tetrámero de la unidad de repetición básica. En cambio, otras enzimas de restricción como Nde I y Msp I muestran un típico patrón de hibridación en escalera, lo que demuestra la existencia de una variación para las dianas de reconocimiento de Nde I y Msp I, las cuales se distribuye al azar entre las distintas unidades de ADN 5S. En el caso de Msp I, además de multímeros formados por unidades de 350 pb, aparecen otros fragmentos de restricción de distinto tamaño que probablemente se deban a la presencia de dos dianas de restricción para Msp I en algunas unidades. El ADN ribosómico 5S, sin embargo, es totalmente resistente a la digestión con Hpa II, lo que indica que las citosinas internas de las dianas de reconocimiento para Msp I ó Hpa II (5'-CCGG-3') se encuentran metiladas.

Además de estas variaciones al azar entre las distintas unidades del ADN 5S, la digestión de esta familia multigénica con Dra I pone de manifiesto la existencia de variaciones que afectan a

unidades que se agrupan en tándem. Así, tras cortar el ADN 5S con Dra I, aunque la mayor parte del mismo permanece sin digerir como una banda de alto peso molecular, una pequeña parte del mismo se digiere hasta fragmentos que se corresponden con el monómero (Fig. 19). Como hemos descrito anteriormente, la hibridación *in situ* pone de manifiesto la existencia de un único cluster de ADN ribosómico 5S, el cual se localiza en el brazo corto del tercer par cromosómico. No obstante, teniendo en cuenta que: a) la técnica de hibridación *in situ* es menos sensible que la de hibridación en Southern-blot, b) el ADN 5S se localiza muy próximo al ADNr 18S, 5.8S y 25S en el cromosoma 3 y c) existe una cluster adicional de genes 18S, 5.8S y 25S en los cromosomas Bs, se podía pensar que esta variación en cluster para la dianas de reconocimiento de Dra I estaría asociada con los cromosomas Bs. Sin embargo, el análisis de distintas digestiones de ADN de plantas con y sin cromosomas Bs con Dra I pone de manifiesto que esta variación está presente tanto en las plantas con Bs como en las plantas sin Bs.

4.5. EL ADN TELOMÉRICO EN LOS CROMOSOMAS A Y B DE C. capillaris.

La caracterización del ADN que forma parte de los telómeros de los cromosomas A y B de *C. capillaris* se ha estudiado mediante hibridación en Southern-blot e hibridación *in situ*. Para ello se ha utilizado como sonda el plásmido pAtT4, el cual contiene una fragmento del ADN telomérico de *Arabidopsis thaliana* (Richards y Ausubel, 1988).

La Fig. 20 muestra la hibridación *in situ* de los cromosomas estándar y Bs de *C. capillaris* con pAtT4. Como puede observarse, los cromosomas As no mostraron ninguna señal de hibridación sobre sus telómeros. En cambio, los telómeros de los cromosomas Bs mostraban una fuerte señal de hibridación. El hecho de no poder detectar el ADN telomérico de los cromosomas As pero sí el de los Bs indicaba que en los cromosomas Bs el ADN que forma parte de los telómeros está

amplificado con respecto al de los cromosomas As, lo que hace que éste pueda ser detectado mediante hibridación *in situ*.

Tras analizar el ADN telomérico mediante hibridación *in situ* en 6 individuos de *C. capillaris* con diferente número de Bs (1-3) se observó que la amplificación que afecta a los telómeros de los cromosomas Bs aparecía en todos los individuos analizados. Sin embargo, los cromosomas Bs de dos de los individuos tenían amplificado únicamente uno de sus telómeros (Figs. 20C-D). Por tanto, aunque morfológicamente todos los cromosomas Bs analizados eran iguales, la hibridación *in situ* con ADN telomérico indicaba la presencia de dos tipos de cromosomas Bs: unos que tenían amplificado el ADN de uno de sus telómeros, y otros en los que el ADN de ambos telómeros estaba amplificado.

La hibridación en Southern-blot del plásmido pAtT4 con el ADN aislado a partir de plantas con y sin cromosomas Bs no solo indicaba la presencia de ADN telomérico adicional en las plantas con Bs sino que demostraba la existencia de variaciones entre el ADN telomérico del genoma estándar y el de plantas con Bs. Así, la digestión del ADN de plantas con y sin Bs con la enzima Mbo I, pone de manifiesto la existencia de varios fragmentos de restricción (RFLPs) específicos del ADN de plantas con Bs (Fig. 21A). De entre un total de 16 individuos analizados (8 sin cromosomas Bs y 8 con 2 cromosomas Bs), los individuos con cromosomas Bs mantenían el mismo polimorfismo respecto a los individuos sin Bs. Ello indicaba que los RFLPs detectados en las plantas con Bs se deben al ADN de los cromosomas Bs.

Para comprobar si la hibridación que mostraba pAtT4 en el genoma de *C. capillaris* era realmente debida a secuencias de los telómeros, el ADN de plantas con y sin cromosomas Bs se digirió parcialmente con la exonucleasa Bal31 y posteriormente se cortó completamente con Mbo I. Después de hibridar en Southern-blot con pAtT4, se observó que tanto la hibridación heterodispersa que mostraba el ADN de plantas sin Bs como las bandas específicas del ADN de los cromosomas Bs disminuían

de tamaño o bien desaparecían a medida que aumentaba el tiempo de digestión con Bal31 (Fig. 21B). Esto demostraba que la hibridación que muestra pAtT4 se debe únicamente a secuencias que se localizan en los extremos de los cromosomas.



Figura 1. Cariotipo de un individuo de *Crepis capillaris* con un cromosoma B. A) Tinción con orceína. B) Bando C. La escala representa 5 μm .

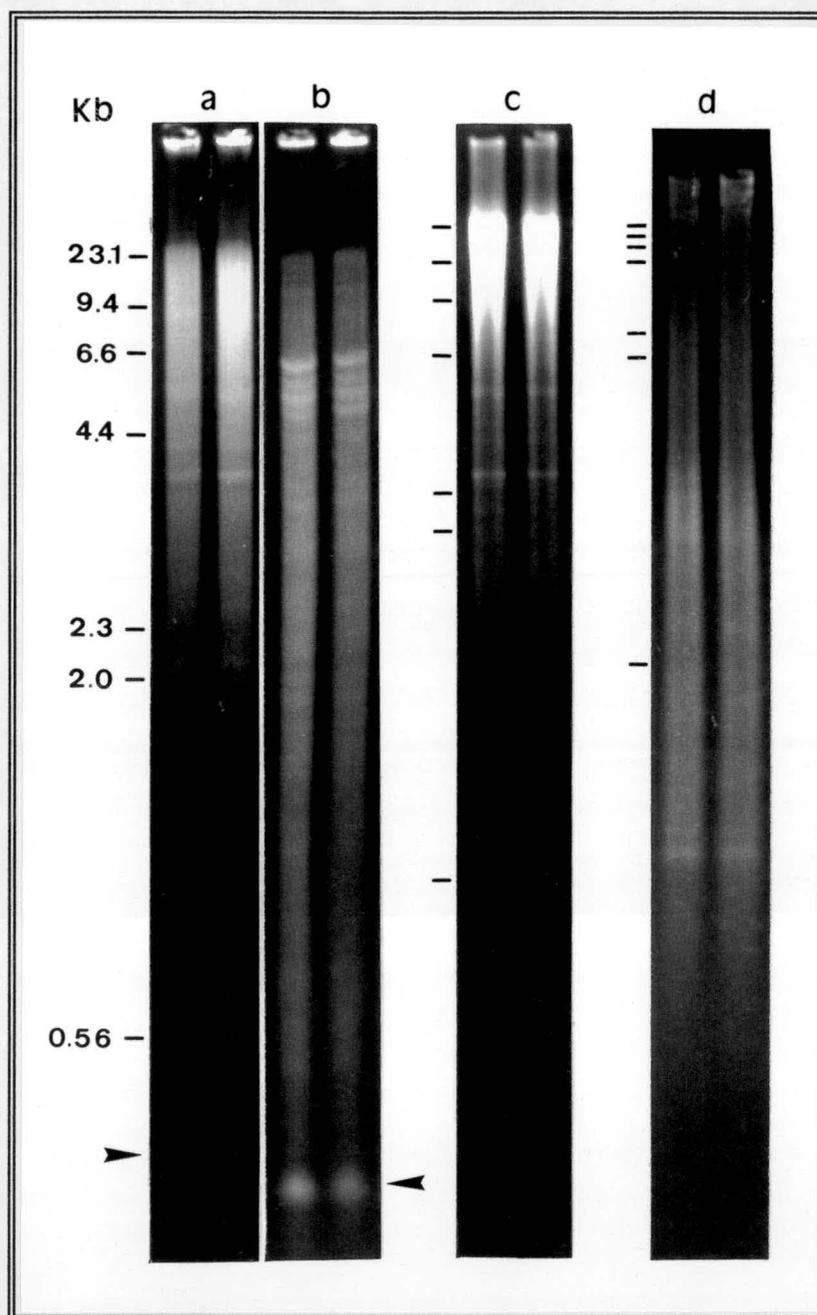


Figura 2. Patrones de digestión del ADN de *C. capillaris* con distintas enzimas de restricción: (a) Eco RI, (b) Dra I, (c) Xba I, (d) Mbo I. En la línea izquierda de cada gel se muestra el ADN de un individuo sin cromosomas Bs, mientras que la línea derecha corresponde al ADN de un individuo con dos cromosomas B. Las puntas de flecha señalan la banda Eco RI de 360 pb y la banda Dra I de 260 pb utilizadas para clonar las familias de ADN altamente repetido Eco RI y Dra I, respectivamente. Al igual que en el resto de las figuras de hibridación en Southern-blot, los números y/o líneas a la izquierda de cada gel señalan el tamaño en Kb y la posición relativa de los marcadores de peso molecular utilizados (ADN del fago lambda digerido con Hind III).

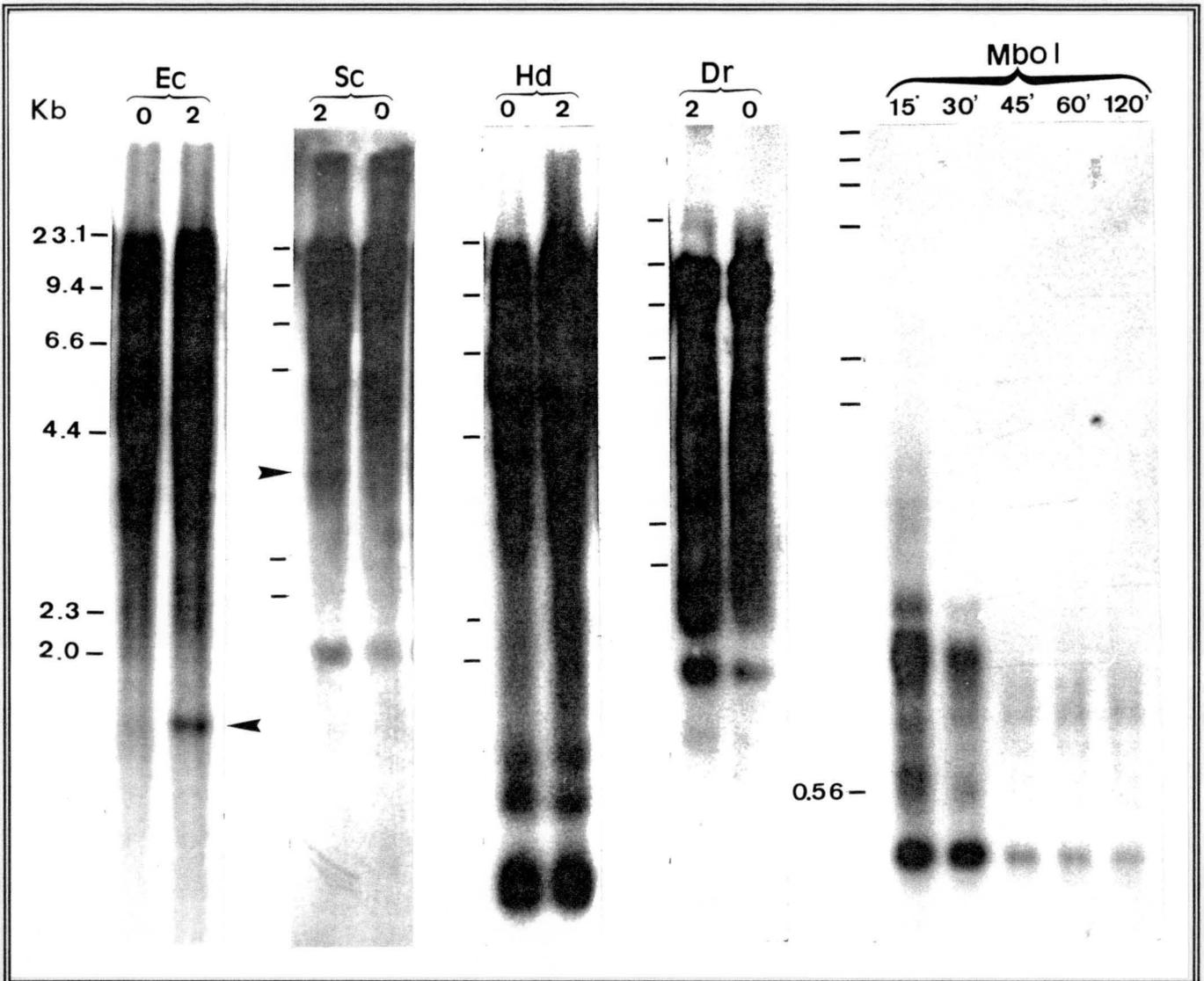


Figura 3. Hibridación en Southern-blot del inserto de pCc21 con el ADN de plantas de *C. capillaris* sin cromosomas B (0) o con dos cromosomas B (2) digerido con Eco RI (Ec), Sac I (Sc), Hind III (Hd), Dra I (Dr). Las puntas de flecha en las digestiones con Eco RI y Sac I señalan los fragmentos de restricción específicos del ADN de los Bs. Las digestiones con Mbo I se llevaron a cabo en el ADN de un individuo sin Bs y a distintos tiempos (15-120 min).

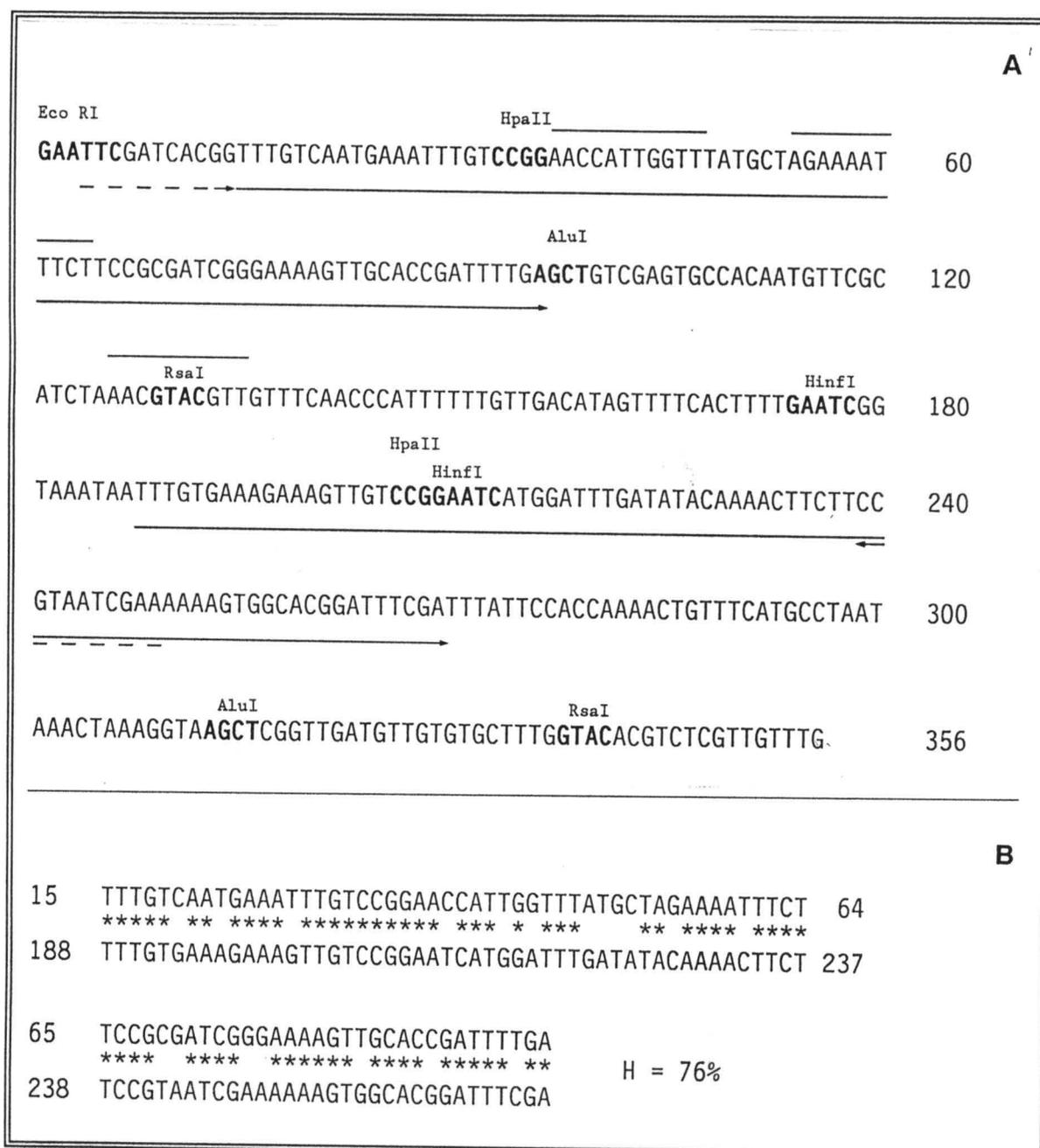


Figura 4. A) Secuencia de nucleótidos del inserto del plásmido pCcE9 (monómero de la familia de ADN repetido Eco RI). Las flechas continuas debajo de la secuencia indican dos subrepeticiones directas de 82 pb, mientras que las flechas discontinuas indican dos subrepeticiones inversas dentro del monómero. Las líneas continuas por encima de la secuencia señalan varias regiones palindrómicas. En negrita se representan las dianas de reconocimiento para algunas enzimas de restricción. B) Homología (H) entre las dos repeticiones directas de 82 pb.

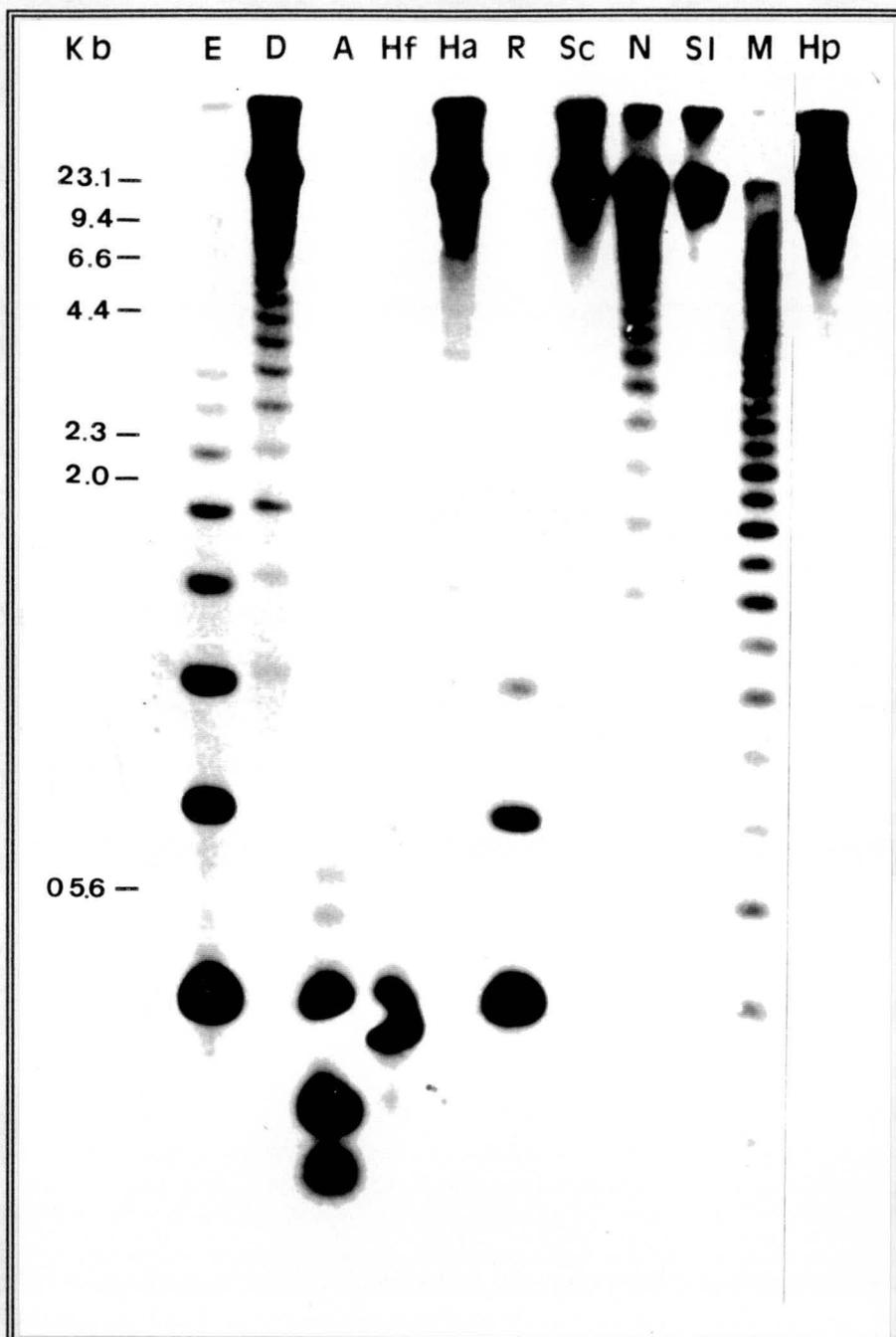
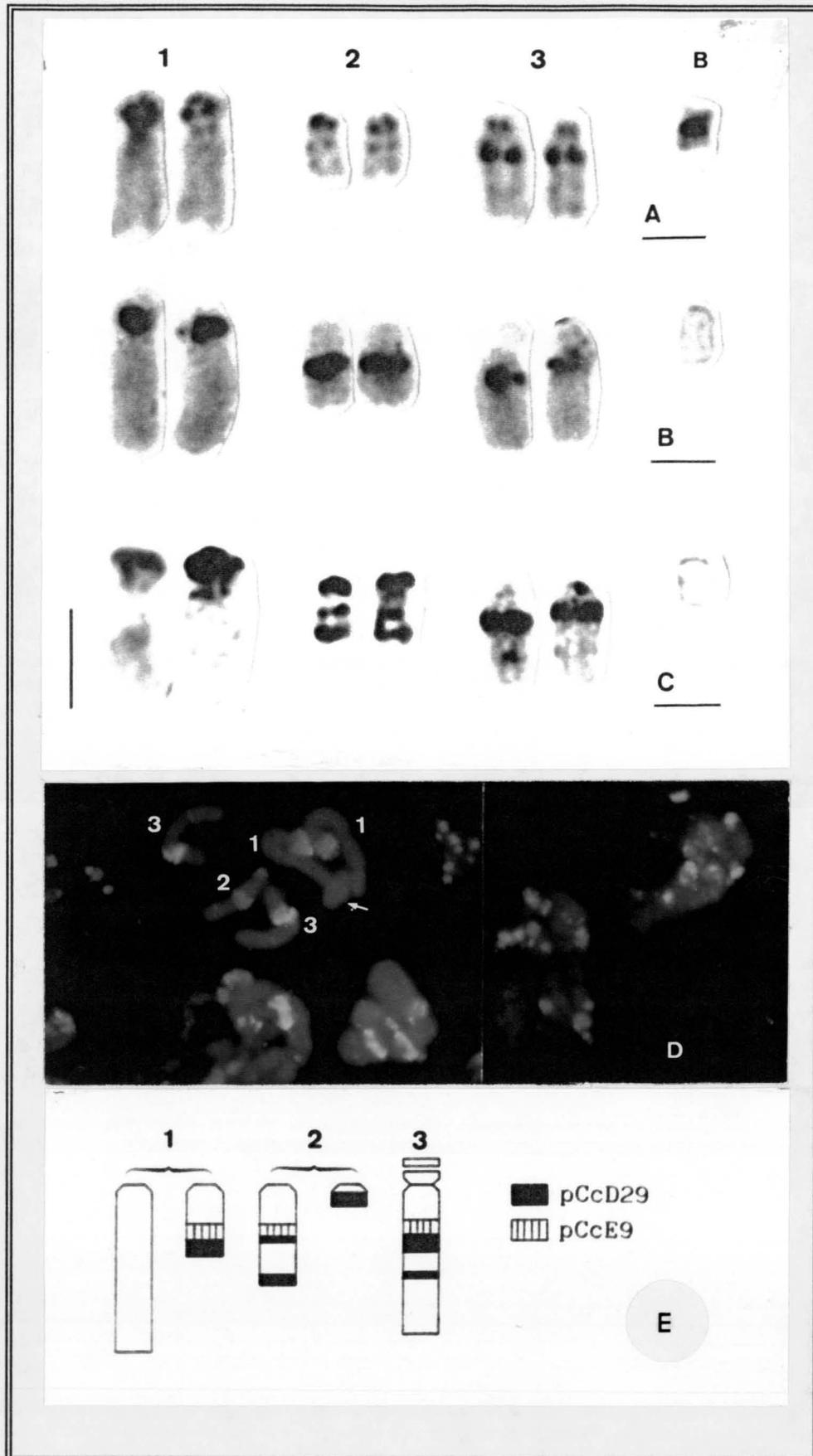


Figura 5. Patrones de hibridación en Southern-blot del inserto del plásmido pCce9 (monómero de la familia Eco RI) con el ADN de *C. capillaris* digerido con Eco RI (E), Dra I (D), Alu I (A), Hinf I (Hf), Hae III (Ha), Rsa I (R), Sac I (Sc), Nde I (N), Sal I (Sl), Msp I (M) y Hpa II (Hp).



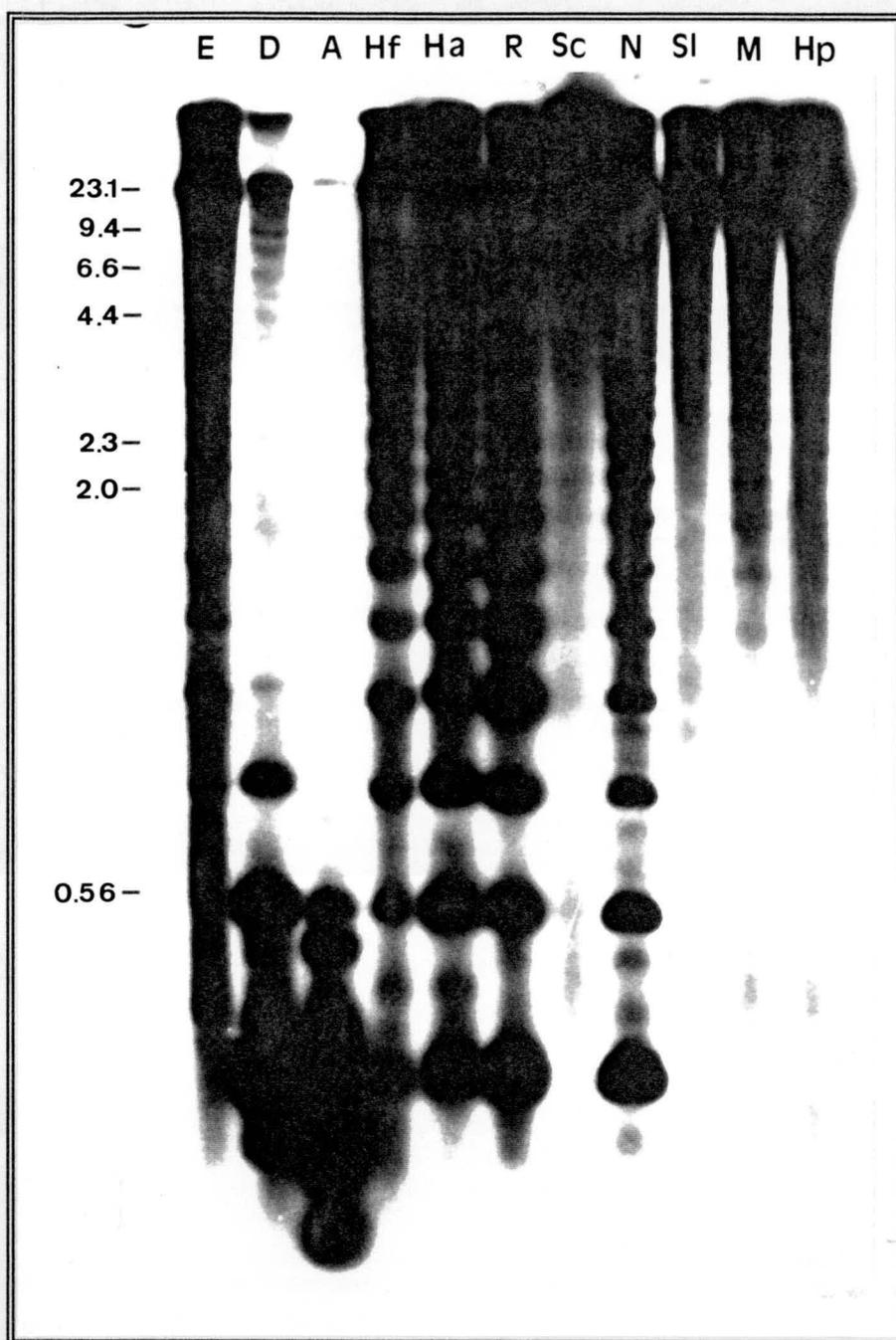


Figura 8. Patrones de hibridación en Southern-blot del inserto del plásmido pCcD29 (monómero de la familia Dra I) con el ADN de *C. capillaris* digerido con Eco RI (E), Dra I (D), Alu I (A), Hinf I (Hf), Hae III (Ha), Rsa I (R), Sac I (Sc), Nde I (N), Sal I (Sl), Msp I (M) y Hpa II (Hp).

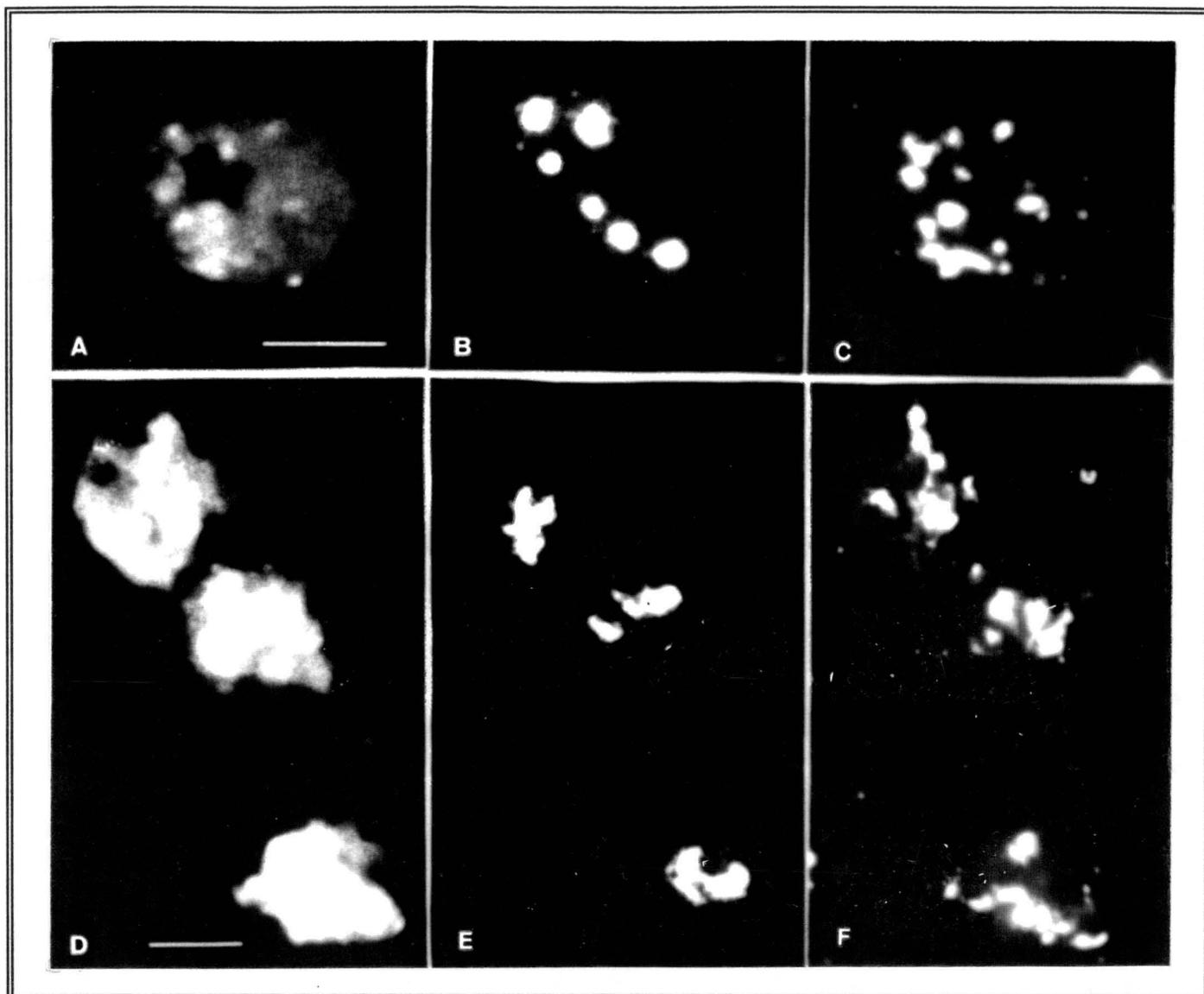


Figura 9. Hibridación simultánea de las familias Eco RI (B y E) y Dra I (C y F) con los núcleos mitóticos (B y C) y meióticos (E y F) de *C. capillaris*. El monómero de la familia Dra I (pCcE9) y el de la familia Dra I (pCcD29) se marcaron con biotina y digoxigenina respectivamente. Tras hibridar sobre preparaciones mitóticas y meióticas, las señales de hibridación de pCcE9 se detectaron con avidina-Texas-Red y las de pCcD29 con antidigoxigenin-FITC. En A y D se muestra la tinción con DAPI de la célula mitótica presente en B y C o de las meióticas presentes en E y F, respectivamente. La escala representa 10 μm .

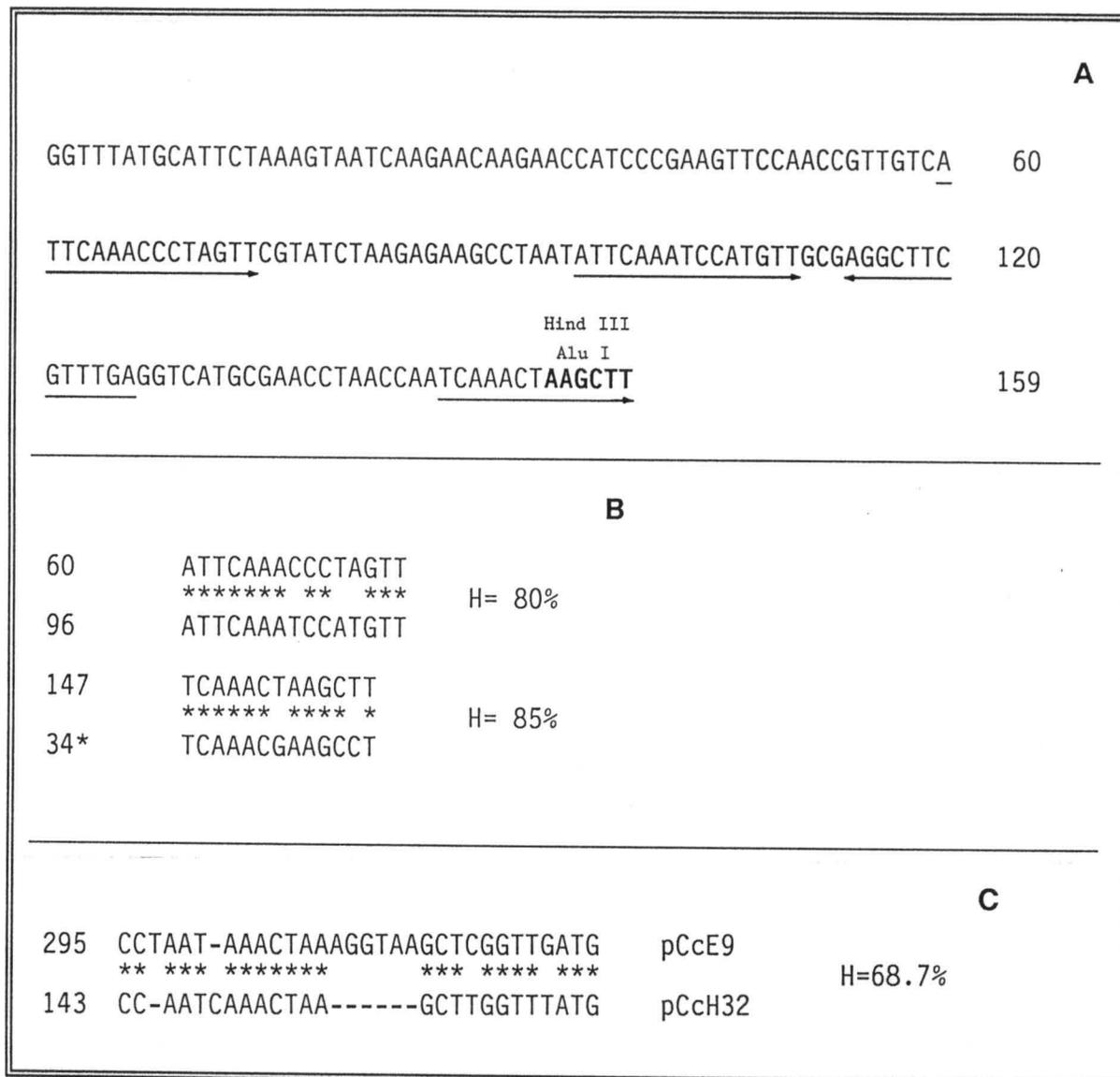


Figura 10. A) Secuencia de nucleótidos del inserto de pCcH32 (monómero de la familia de ADN repetido Hind III). Las flechas señalan varias subrepeticiones dentro de la secuencia. Las dianas de alguna enzima de restricción se representan en negrita. B) Homología (H) entre las subrepeticiones internas mostradas en A. C) Homología (H) entre una región de las secuencias del monómero de la familia Eco RI (pCcE9) y el de la familia Hind III (pCcH32).

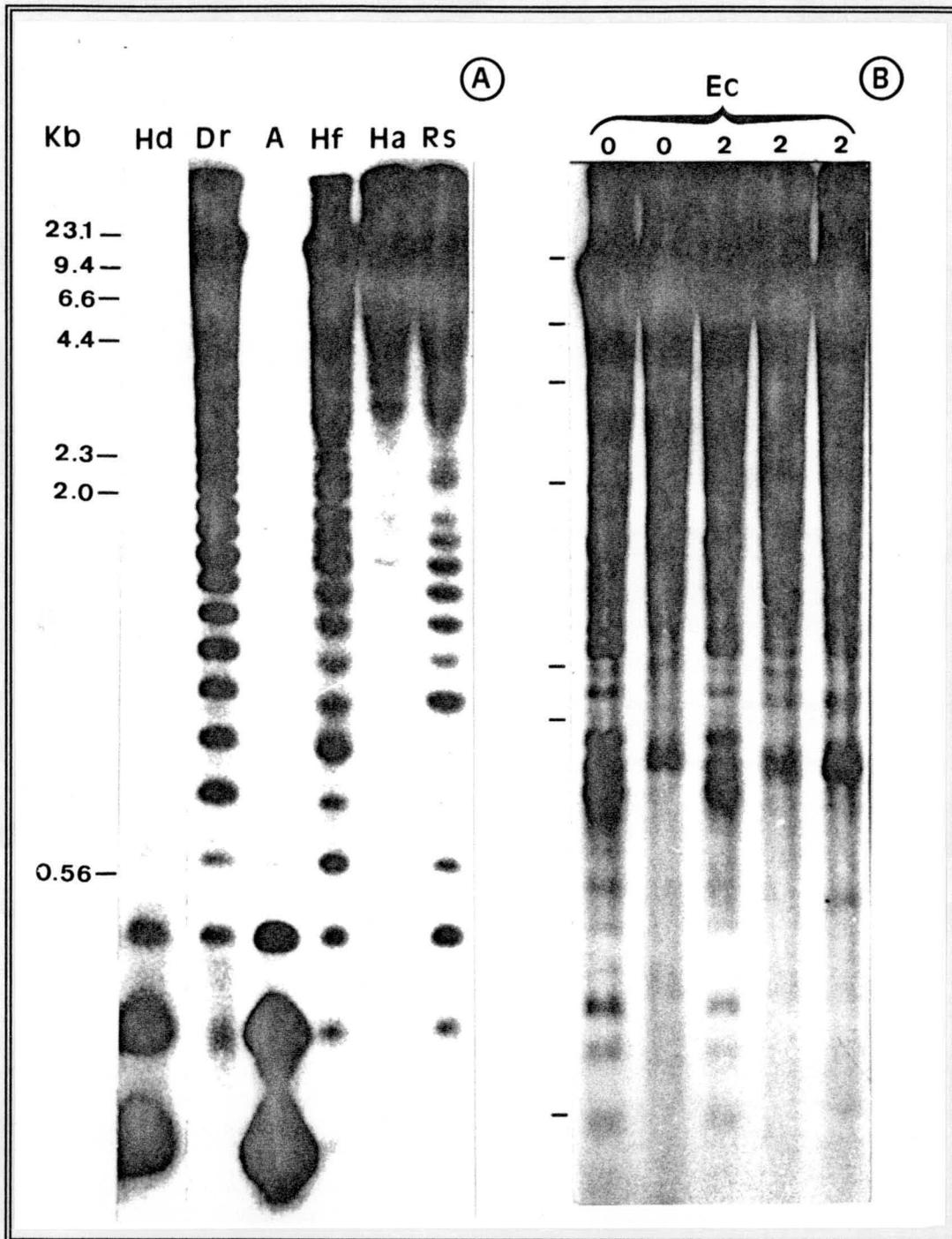


Figura 11. A. Patrones de hibridación en Southern-blot del inserto de pCch32 (monómero de la familia Hind III) con el ADN de *C. capillaris* digerido con Hind III (Hd), Dra I (D), Alu I (A), Hinf I (Hf), Hae III (Ha) y Rsa I (Rs). B. Hibridación en Southern blot de pCch32 con el ADN de varios individuos de *C. capillaris* sin cromosomas Bs (0) o con dos Bs (2) digerido con Eco RI.

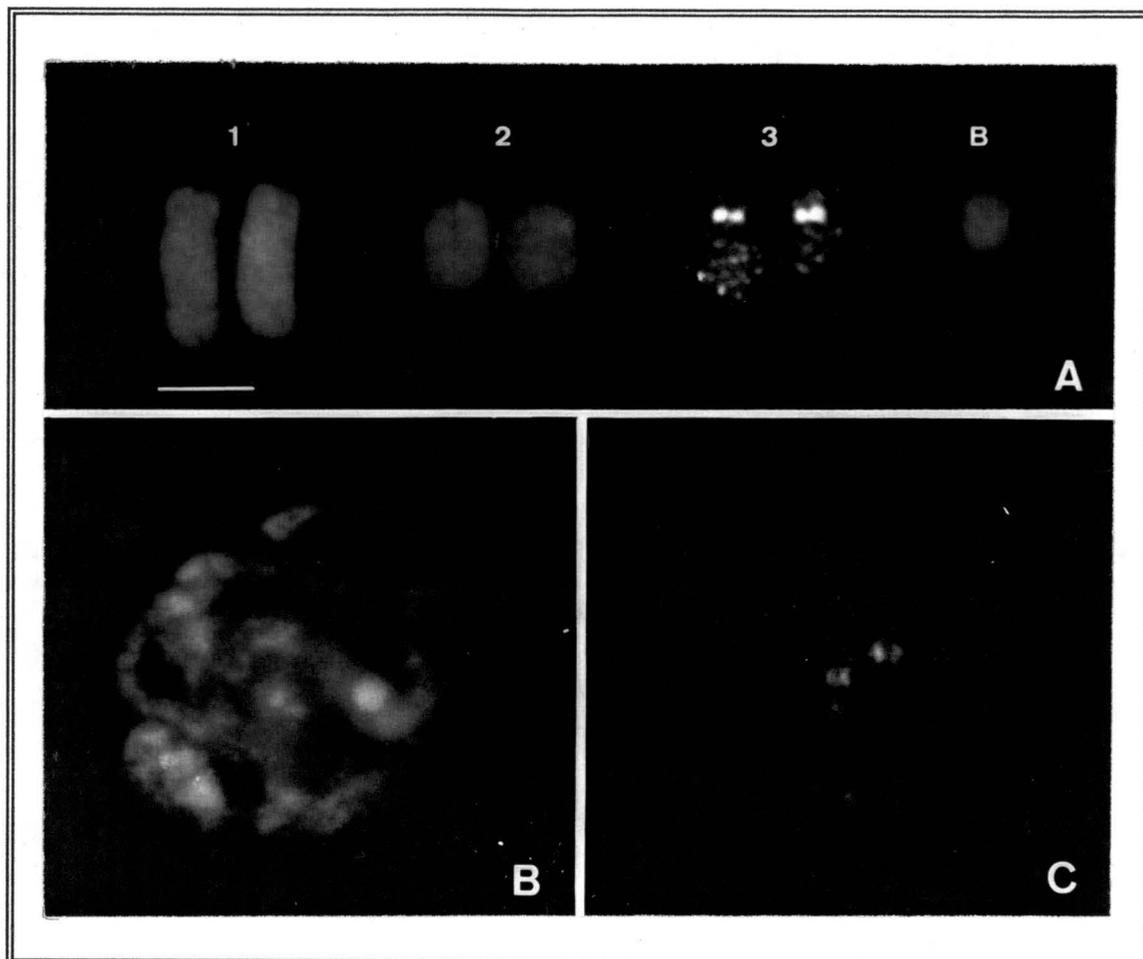


Figura 12. A) Cariotipo de *C. capillaris* mostrando la hibridación *in situ* del inserto de pCCH32 (monómero de la familia Hind III). B-C) Tinción con DAPI (B) e hibridación *in situ* con pCCH32 (C) de la misma profase mitótica de *C. capillaris*. El inserto del plásmido pCCH32 se marcó con digoxigenina y se utilizó para hibridar preparaciones cromosómicas mitóticas de *C. capillaris*. Las señales de hibridación se detectaron con antidigoxigenina-FITC y los cromosomas se tiñeron con DAPI. La escala representa 5 μm .

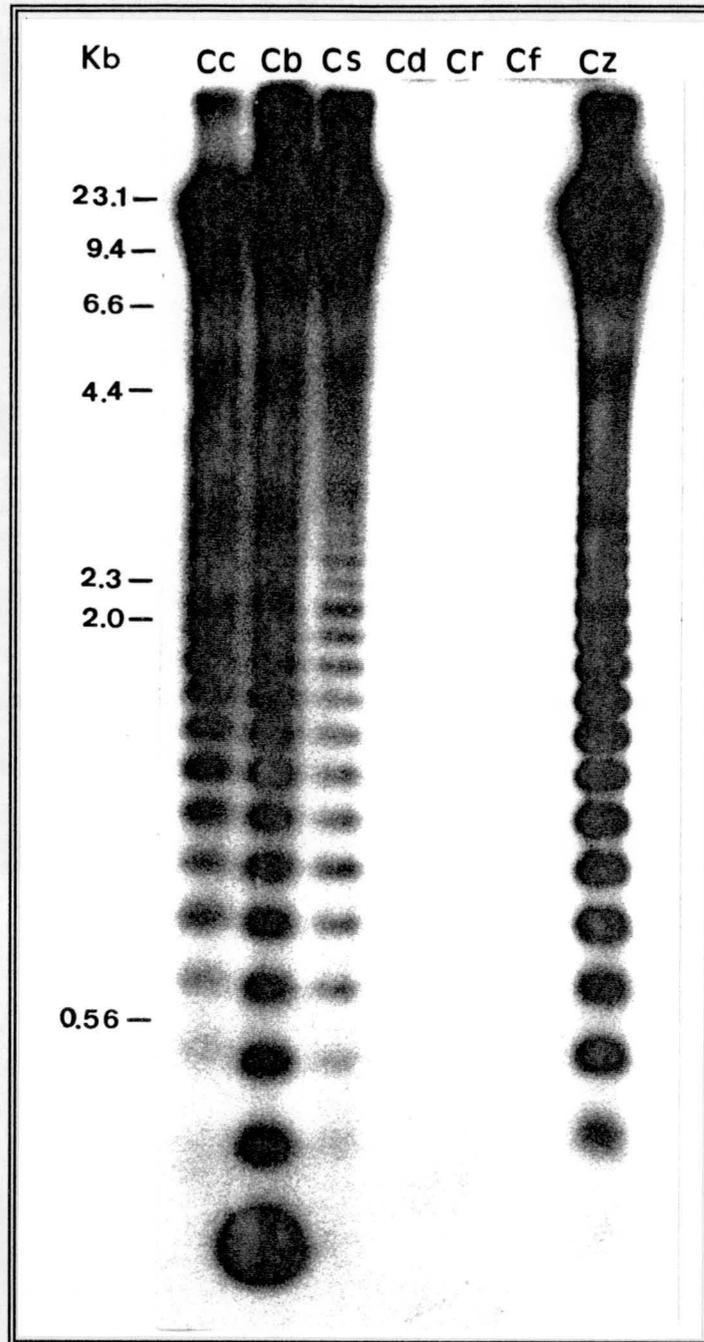


Figura 13. Hibridación en Southern-blot del monómero de la familia Hind III (pCCH32) con el ADN de distintas especies del género *Crepis* digerido con *Dra* I. *C. capillaris* (Cc), *C. biennis* (Cb), *C. setosa* (Cs), *C. dioscoridis* (Cd), *C. rubra* (Cr), *C. foetida* (Cf) y *C. zacintha* (Cz).

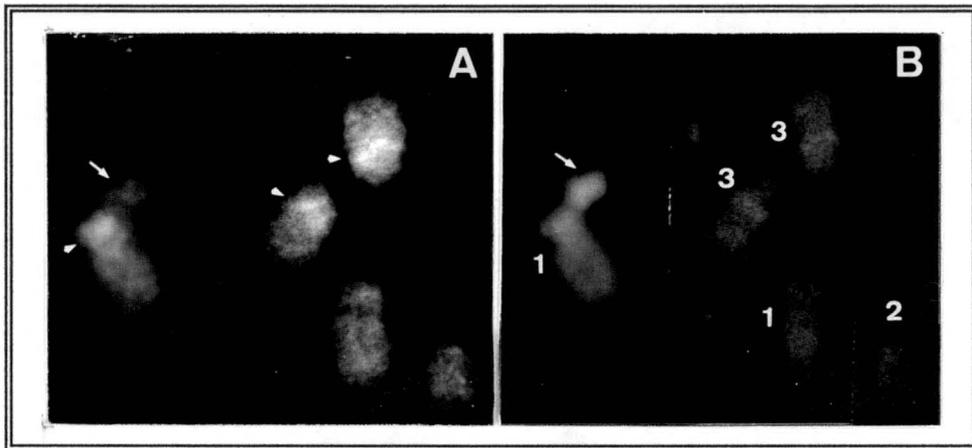
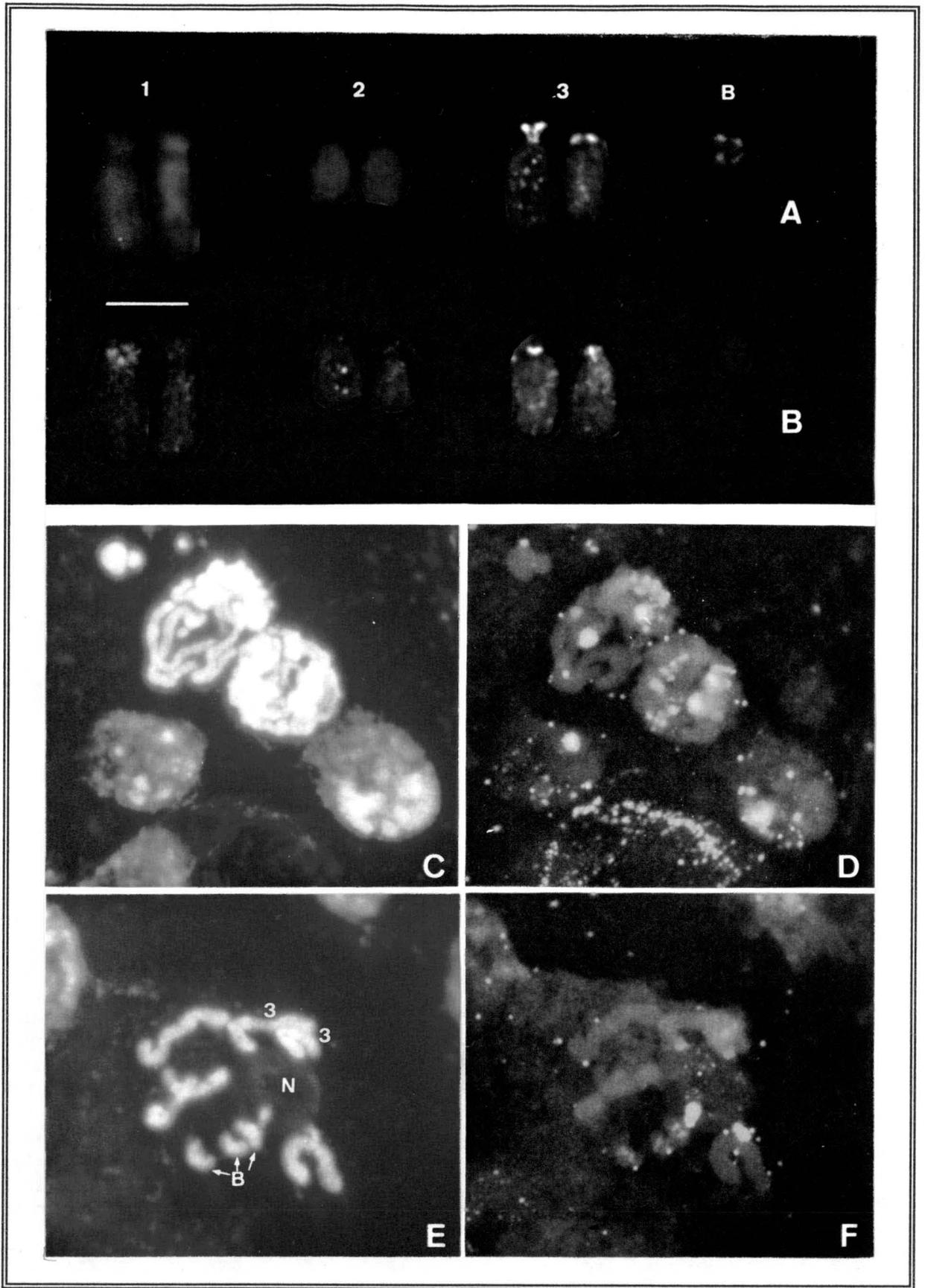
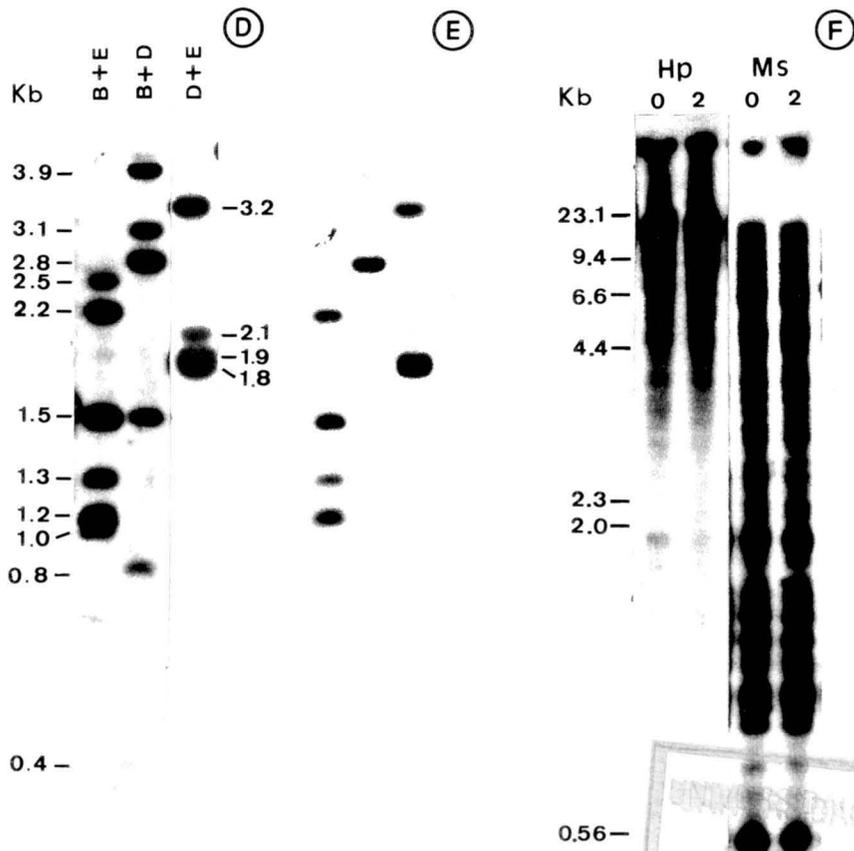
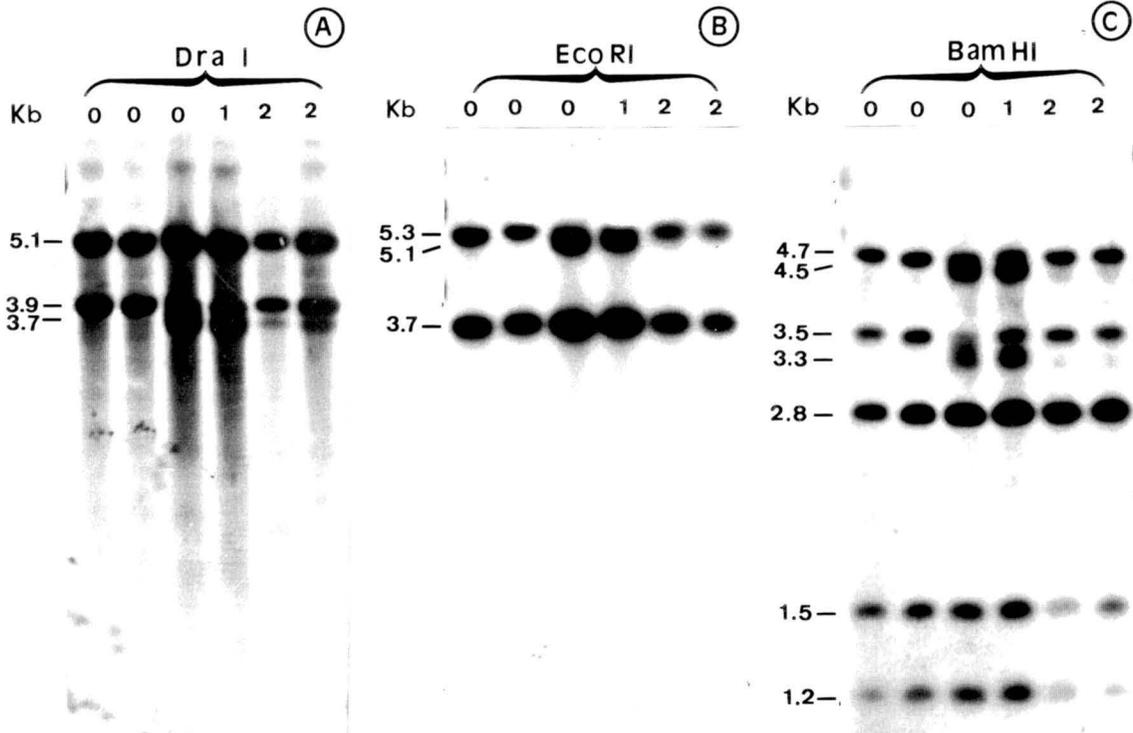
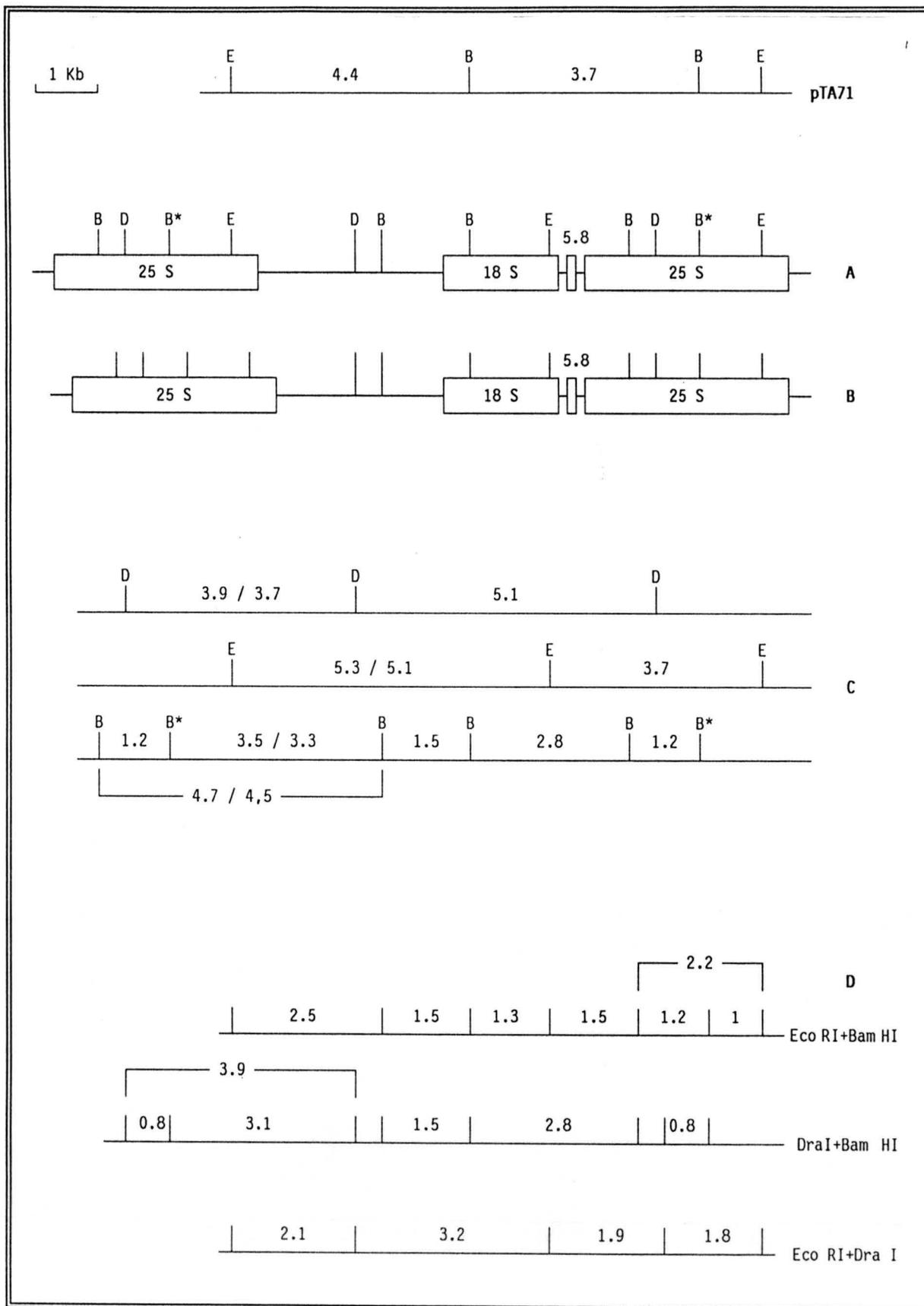


Figura 14. A) Hibridación *in situ* de los cromosomas mitóticos de *C. capillaris* con ADN genómico de una planta sin cromosomas Bs. B) Tinción con DAPI de estos mismos cromosomas. El ADN genómico de la planta se marcó con biotina y se utilizó para hibridar preparaciones cromosómicas con cromosomas B. Las señales de la hibridación se detectaron con avidina-Texas-Red y los cromosomas se tiñeron con DAPI. Obsérvese que los cromosomas Bs (flecha) hibridan de la misma forma que los As, y que las señales de hibridación más intensas que se observan en la heterocromatina de los As (cabezas de flecha) no aparecen en la heterocromatina paracentromérica del B.





UNIVERSIDAD DE GRANADA
NOV. 1992
COMISION DE DOCTORADO



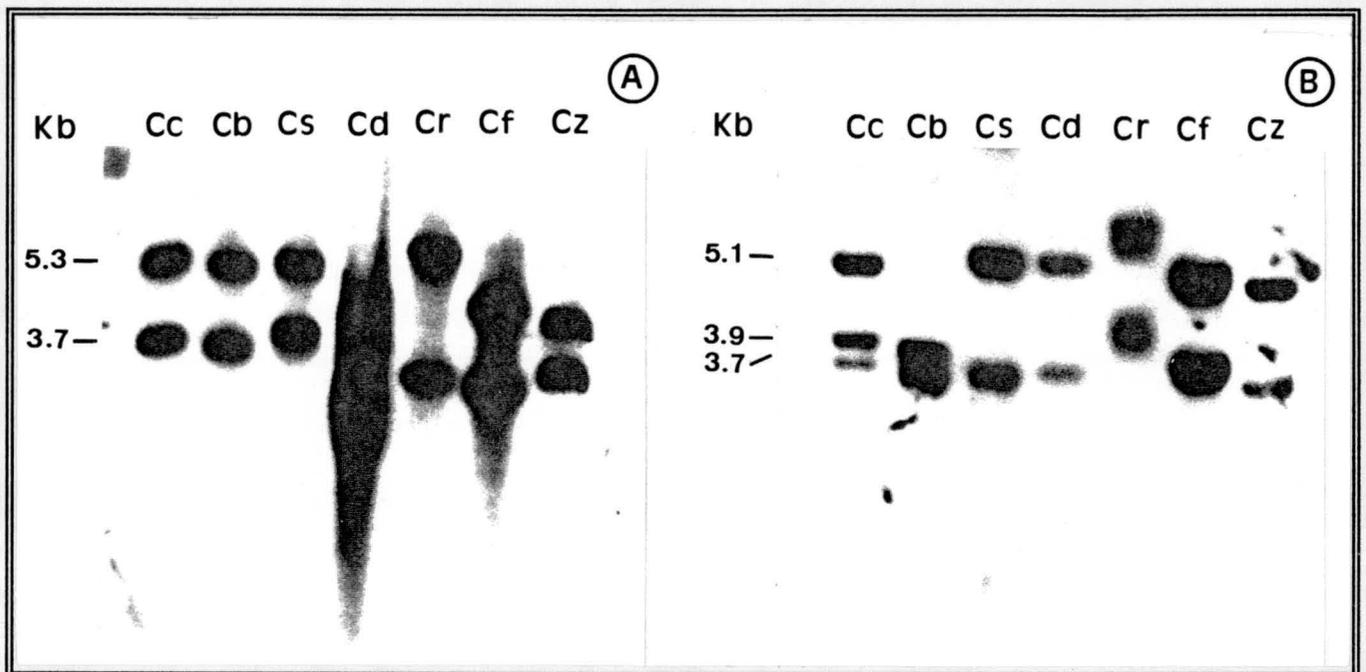


Figura 18. Hibridación en Southern-blot del inserto de pTA71 (ADNr) con el ADN de distintas especies de *Crepis* digerido con Eco RI (A) o Dra I (B). *C. capillaris* (Cc), *C. biennis* (Cb), *C. setosa* (Cs), *C. dioscoridis* (Cd), *C. rubra* (Cr), *C. foetida* (Cf), *C. zacintha* (Cz).

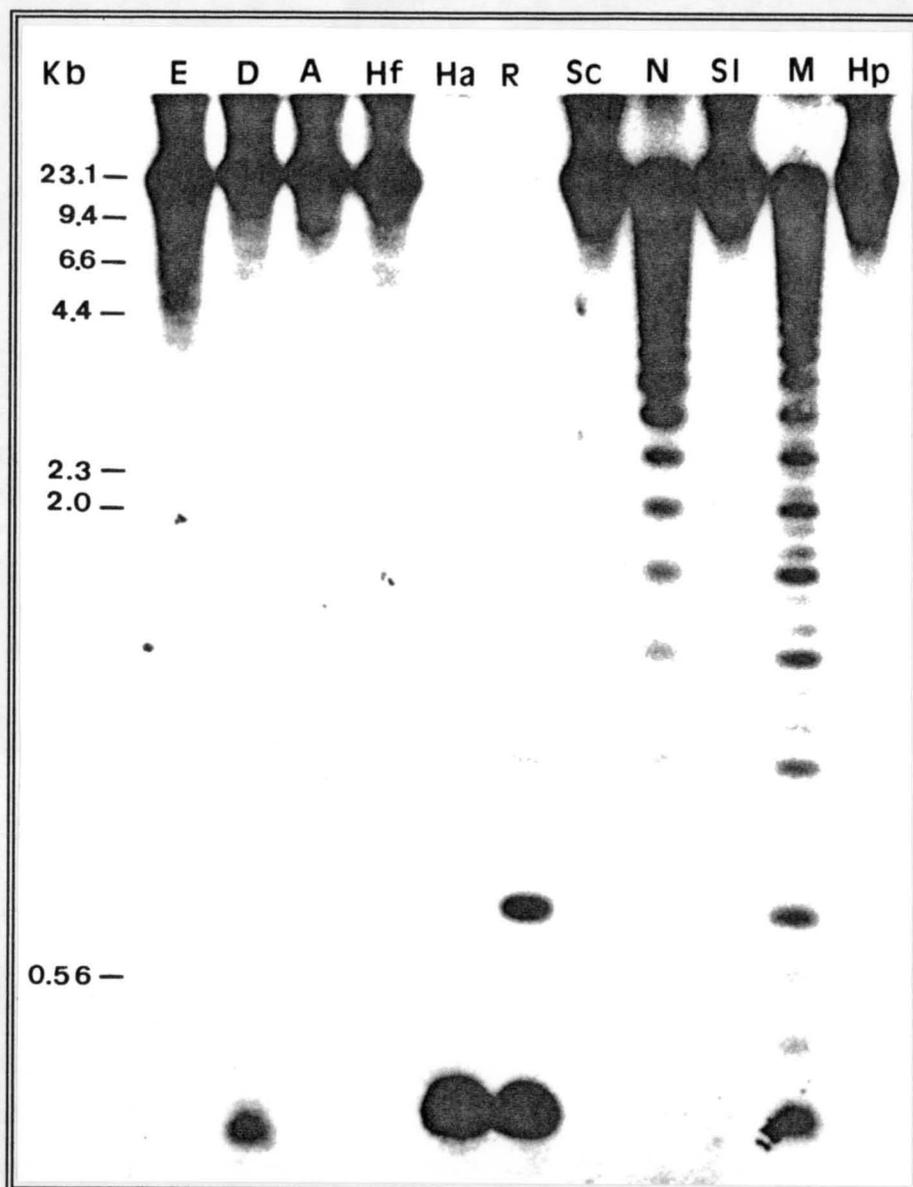


Figura 19. Hibridación en Southern-blot del inserto del plásmido cP5S (ADN 5S) con el ADN de *C. capillaris* digerido con Eco RI (E), Dra I (D), Alu I (A), Hinf I (Hf), Hae III (Ha), Rsa I (R), Sac I (Sc), Nde I (N), Sal I (SI), Msp I (M) y Hpa II (Hp).

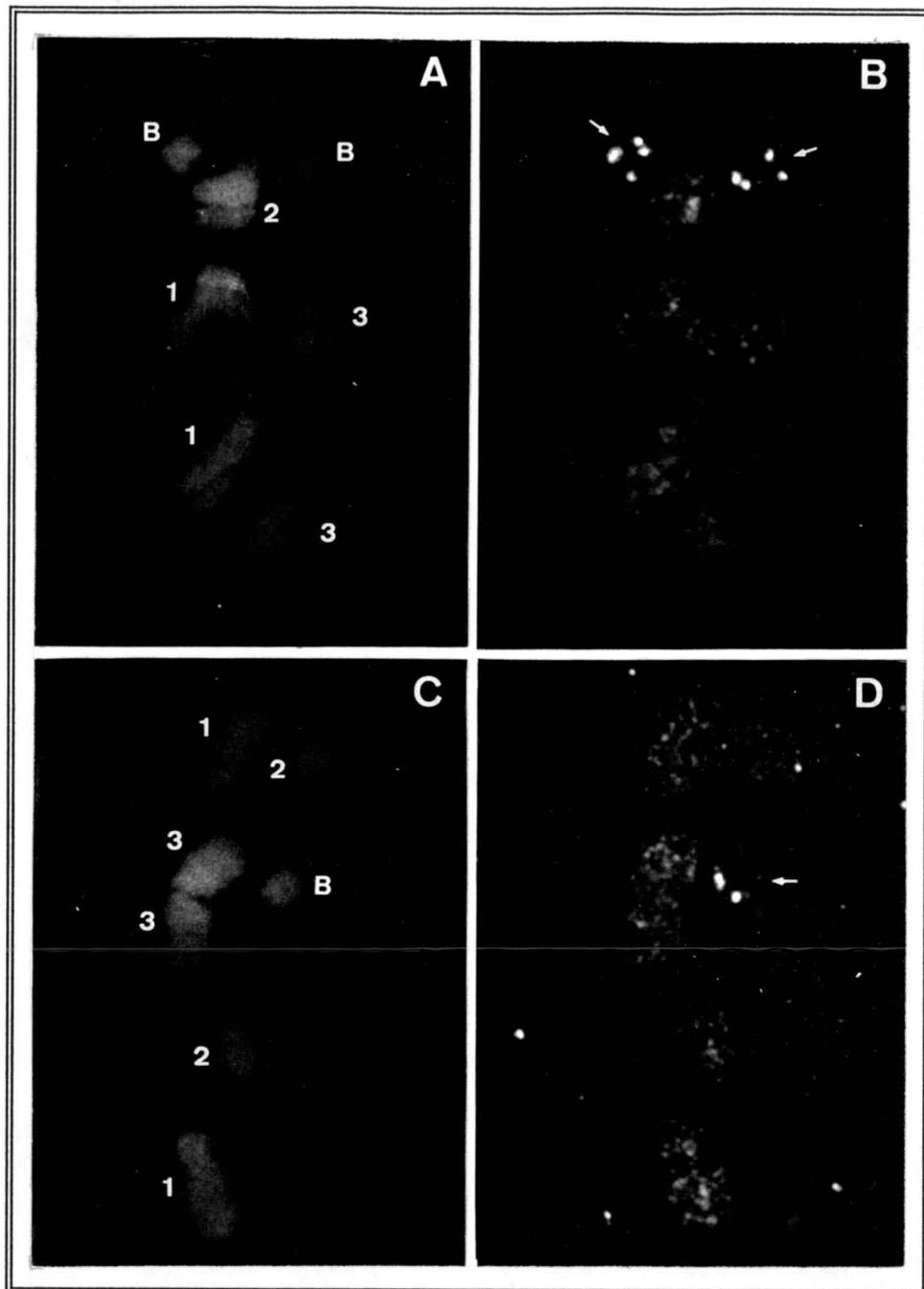


Figura 20. Hibridación *in situ* del ADN telomérico de pAtT4 con los cromosomas A y B de *C. capillaris*. B) Metafase mitótica de un individuo con los dos telómeros del B amplificados, y D) de un individuo en el que los Bs solo tienen amplificado uno de sus telómeros. A y C) Tinción con DAPI de las células B y D, respectivamente. Las flechas señalan la hibridación del ADN telomérico sobre los cromosomas B.

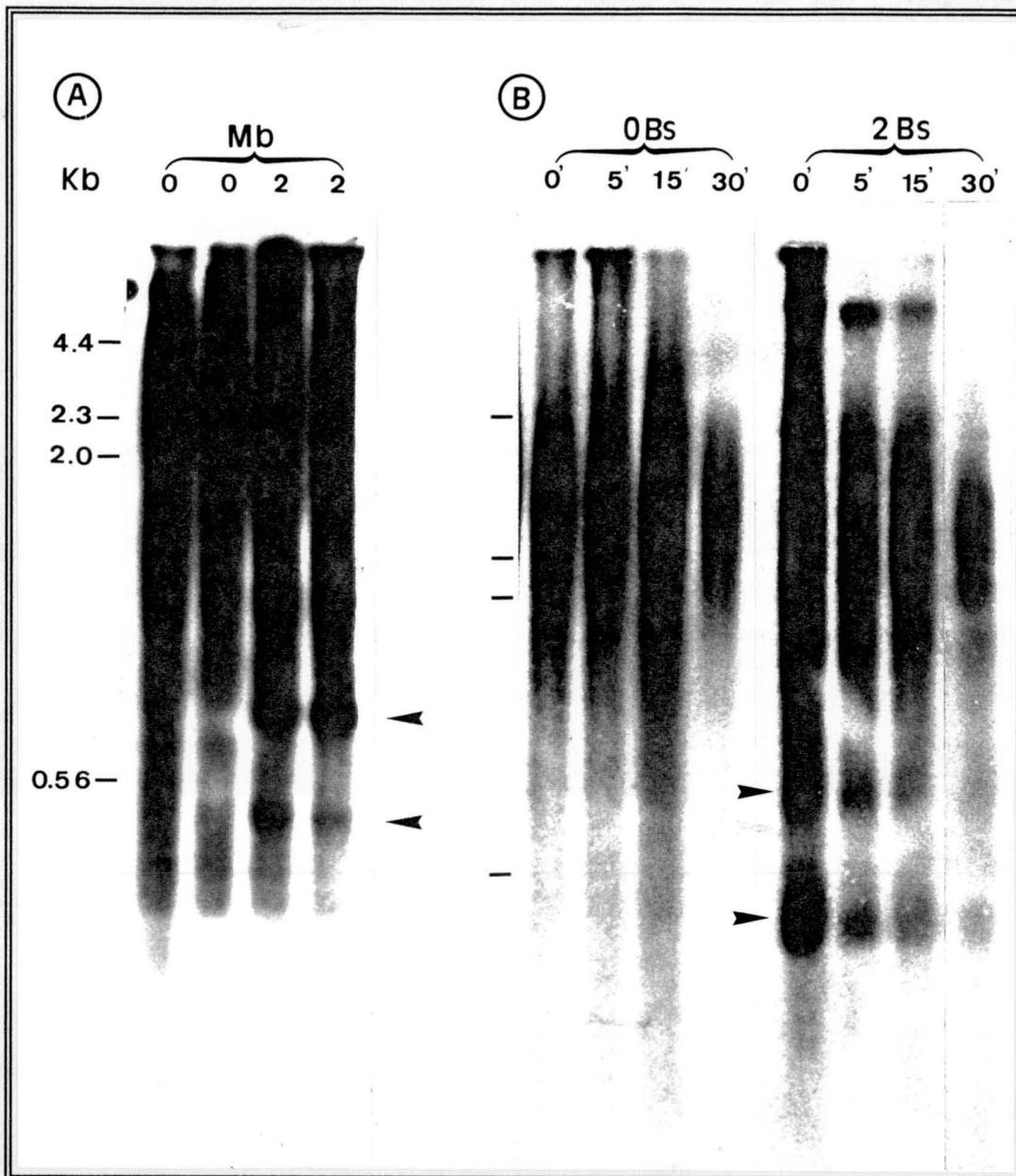
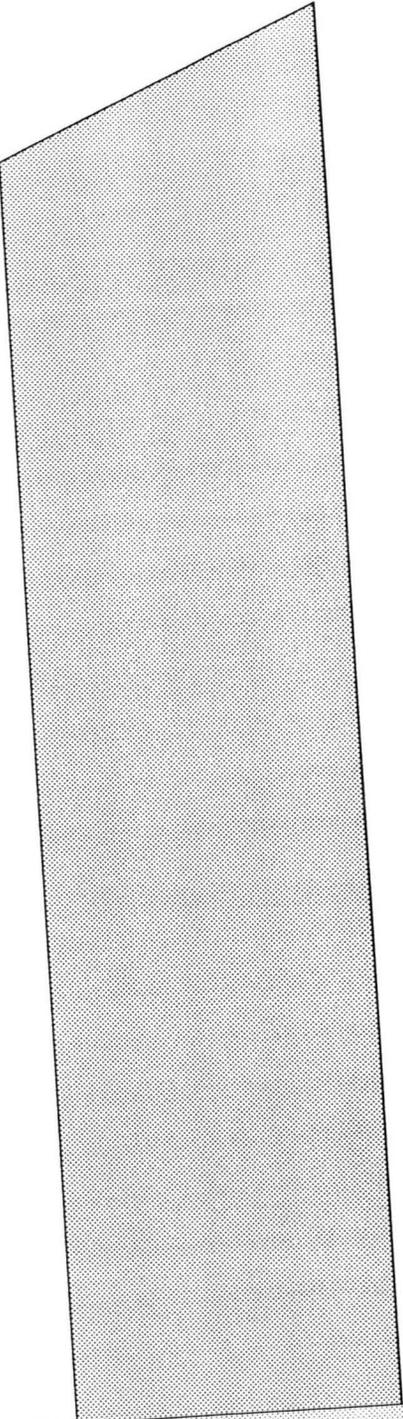


Figura 21. A) Hibridación en Southern del inserto de pAtT4 con el ADN de plantas de *C. capillaris* sin cromosomas B (0) o con dos cromosomas B (2) digerido con Mbo (Mb). Las flechas señalan los fragmentos de restricción específicos del ADN de plantas con Bs. B) El ADN de plantas con y sin cromosomas B se digirió a distintos tiempos (0-30 min) con la exonucleasa Bal 31 antes de ser digerido completamente con Mbo I. Obsérvese como los fragmentos de restricción detectados por pAtT4 tanto en el ADN de plantas sin Bs como en el de plantas con Bs disminuyen de tamaño o desaparecen a medida que aumenta el tiempo de digestión con la exonucleasa.



5

DISCUSSION

5. DISCUSION

5.1. EL ADN SATELITE DE Crepis capillaris

En el presente trabajo se han clonado y analizado tres secuencias de ADN altamente repetido del genoma de *C. capillaris* que presentan características típicas de ADN satélite (Brutlag, 1980; Singer, 1982) tales como:

a) Las tres familias analizadas (familia Eco RI, Dra I y Hind III) están formadas por unidades que se repiten del orden de 10^5 - 10^6 en el genoma haploide de *C. capillaris*.

b) El patrón de hibridación en Southern-blot mostrado por cada una de las familias indica que están constituidas por unidades de pequeño tamaño que se repiten en tándem formando grandes clusters.

c) Al igual que la mayor parte del ADN satélite descrito en otras especies, estas familias se localizan principalmente en las regiones de heterocromatina constitutiva de *C. capillaris*. Las familias Eco RI, Dra I y Hind III constituyen aproximadamente el 11.5% del genoma haploide de *C. capillaris*. Esto significa que la heterocromatina constitutiva de *C. capillaris*, que representa aproximadamente el 13% del genoma haploide de la especie, está mayoritariamente formada por estas tres familias de ADN altamente repetido.

5.1.1. SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DE LOS ADNs SATELITE DE Crepis capillaris

La longitud de los monómeros de cada uno de los tres ADNs satélite de *C. capillaris* (357 pb en el caso del monómero Eco RI, y 259 y 159 pb para los monómeros Dra I y Hind III, respectivamente)

está de acuerdo con el tamaño de las unidades repetidas de otros ADNs satélites de plantas, entre los que existen unidades que oscilan entre 150 y 500 pb (Lapitan, 1992). El contenido en G+C de las repeticiones de los tres ADNs satélite es muy similar: 42% para el monómero Eco RI, y 42.7% y 40% para los monómeros Dra I y Hind III respectivamente, siendo comparable al contenido medio en G+C del ADN genómico de *C. capillaris* (36.7%) (Sacristan y Dobrigkeit, 1973).

La secuenciación de una de las unidades de cada satélite nos ha permitido analizar las repeticiones internas dentro de cada monómero, así como el grado de conservación entre las secuencias de distintos ADNs satélite dentro de una misma especie o entre el ADN satélite de especies diferentes.

A) Subrepeticiones internas dentro de la unidad de repetición del satélite.

Tal y como puede observarse en las Figs. 4 y 10, tanto la secuencia del monómero de la familia Eco RI como el de la familia Hind III muestran subrepeticiones dentro de la unidad básica de repetición. En concreto, el monómero de la familia EcoRI, pCcE9, posee dos repeticiones directas de 82 pb con una homología entre ellas del 76%, mientras que el de la familia Hind III, pCCH32, posee varias subrepeticiones de menor tamaño. Estas subrepeticiones internas dentro la unidad básica de repetición sugieren que las unidades de los satélites Eco RI y Hind III pueden haberse originado a partir de unidades repetidas más cortas, las cuales han ido divergiendo como consecuencia de cambios puntuales, inserciones y deleciones. La presencia de subunidades repetidas es muy común en el caso de los ADNs satélites animales (Singer, 1982), y asimismo se han encontrado también en algunos satélites de plantas (Grellet *et al.*, 1986; Vershinin *et al.*, 1990; Sibson *et al.*, 1991; Schmidt y Metzloff, 1991).

En algunos casos, cada unidad del satélite está formada por subrepeticiones que también se repiten en tándem (Singer, 1982; Grellet *et al.*, 1986; Sibson *et al.*, 1991). Este tipo de organización indica que el satélite ha sufrido varias rondas de amplificación y divergencia, de forma que cada cierto periodo de tiempo, un grupo de unidades repetidas se amplifican dando lugar a copias en tándem idénticas, las cuales divergen entre cada periodo de amplificación (Singer, 1982). Según este modelo, las divergencias entre las subrepeticiones de las unidades de un satélite reflejarían el periodo de tiempo entre una amplificación y la siguiente. No obstante, las unidades del satélite también pueden divergir como consecuencia de largas inserciones o deleciones tal y como se ha demostrado en el satélite de centeno definido por unidades de 180 pb (Bedbrook *et al.*, 1980) o en el satélite de *Cucumis sativus* (Ganal *et al.*, 1986; Ganal y Hemleben, 1988). El hecho de que las subrepeticiones internas dentro de las unidades de los satélites Eco RI y Hind III de *C. capillaris* no aparezcan en tándem indicaría que las unidades de estos satélites no solo han divergido como consecuencia de cambios puntuales sino también mediante deleciones y/o inserciones de otras secuencias no relacionadas con el satélite.

Por otro lado, la unidad básica del satélite Dra I, al igual que ocurre con las unidades de otros ADNs satélite (Martínez-Zapater *et al.*, 1986; Barnes *et al.*, 1985), carece de repeticiones internas. Estos ADNs satélite podrían ser más antiguos o tener una función distinta que aquellos que presentan subrepeticiones internas en la unidad de repetición (Brutlag, 1980).

B) Grado de conservación del ADN satélite entre distintas especies.

En otros casos se han detectado pequeñas regiones de homología entre ADNs satélite de especies evolutivamente lejanas (Brutlag, 1980; Grellet *et al.*, 1986). Sin embargo, las secuencias de ADN satélite de *C. capillaris* no han mostrado ninguna homología con otras secuencias

de ADN repetido o único presentes en la base de datos de EMBL. Esto no es nada sorprendente si pensamos que el ADN repetido, y en especial el ADN satélite, es una de las regiones del genoma que evolucionan más rápidamente siendo normalmente característico de una especie o de un grupo de especies muy relacionadas (Singer, 1982). De hecho, los satélites Eco RI y Dra I son específicos de *C. capillaris* no apareciendo tampoco en otras especies del género *Crepis*. En cambio, el satélite Hind III se encuentra presente en el genoma de ciertas especies del género tales como *C. biennis*, *C. setosa* y *C. zacintha*, pero no en el de *C. dioscoridis*, *C. rubra* o *C. foetida*. Las secuencias homólogas ADN satélite Hind III existentes en el genoma de estas tres especies se organizan de igual forma que el genoma de *C. capillaris*, a la vez que conservan una alta homología (la unidad repetida de pCCH32 es capaz de hibridar sobre el genoma de estas tres especies incluso en condiciones de alta astringencia). Estos datos sugieren que la familia Hind III se ha amplificado en un ancestral común a estas cuatro especies y que, por tanto, *C. capillaris*, *C. biennis*, *C. setosa* y *C. zacintha*, aunque se han clasificado en secciones diferentes dentro del género (Babcock, 1947), y poseen números cromosómicos y cantidades de ADN muy diferentes (Jones y Brown, 1976), están evolutivamente más próximas entre sí que con el resto de las especies analizadas. Por otro lado, la ausencia de las familias Eco RI y Dra I en el genoma de estas mismas especies indicaría que son familias más jóvenes y que se han amplificado únicamente en el genoma de *C. capillaris*.

Aunque los distintos ADNs satélite detectados en *C. capillaris* no mostraron homología con otras secuencias repetidas de animales o plantas, comparten entre sí pequeñas regiones homólogas. En concreto, pCcE9 y pCcD29 comparten una región de 37 pb con un 67% de homología (Fig. 7B), y pCcE9 y pCCH32 muestran un 78% de homología en una región de 32 pb (Fig. 10C). Estas homologías podrían indicar que los tres satélites de *C. capillaris* derivan de una secuencia común, la cual ha ido divergiendo de forma independiente en cada uno de los satélites. Por otro lado, la proximidad de estos satélites en ciertas regiones

cromosómicas (pCcE9 y pCcD29 se localizan en las mismas bandas C de algunos cromosomas y pCcE9 y pCcH32 se localizan juntos en brazo largo del tercer par cromosómico) hace pensar que estos tres ADN satélite derivan unos de otros. De hecho, la evolución del ADN satélite mediante ciclos alternantes de mutación, y amplificación y delección puede hacer divergir un determinado satélite hasta originar dos satélites relacionados (Singer, 1982; Ganal *et al.*, 1986; Ganal y Hemleben, 1988).

5.1.2. ORGANIZACION GENOMICA

A) Las familias Eco RI y Dra I

El patrón de hibridación en escalera que muestran las familias Eco RI y Dra I (Figs. 5 y 8) indica claramente que los miembros que las forman se organizan en tándem formando largos clusters en el genoma de *C. capillaris*. Este patrón de digestión pone de manifiesto también la existencia de variaciones en los sitios de restricción, y por tanto en la secuencia de nucleótidos entre las distintas unidades que componen cada uno de los satélites. No obstante, la familia Dra I muestra un mayor grado de variación. De hecho, en este último satélite algunas enzimas originan un patrón de hibridación en escalera formado por unidades que oscilan entre 260 pb (correspondiente al monómero) hasta unidades de alto peso molecular (Fig. 8). Este patrón de hibridación multimérico se debe a una gran variación para los sitios de restricción de distintas enzimas, los cuales se distribuyen al azar entre los distintos miembros del satélite (Brutlag, 1980; Singer, 1982; Flavell, 1982a). Además, en ciertas digestiones aparecen fragmentos de restricción que no son múltiplos de la unidad básica de repetición de la familia Dra I (Fig. 8). Estos fragmentos podrían deberse a variaciones en los sitios de restricción para estas enzimas, de forma que algunas unidades tenga dos o más dianas de restricción o a variaciones en la longitud de las unidades de repetición del satélite. Además, en las digestiones con Alu I y Dra I, aunque la

mayor parte del satélite Dra I se digiere en multímeros de bajo peso molecular, una parte del mismo permanece como ADN de alto peso molecular (Fig. 8). Esto indica que la pérdida de las dianas de restricción para Alu I o Dra I en algunas unidades no se produce al azar sino que afecta a unidades que se agrupan en tándem.

Sin embargo, solamente se detectaron ciertas variaciones aleatorias para sitios de restricción entre los miembros del satélite Eco RI. Algunas enzimas digieren la mayor parte del satélite dando lugar a multímeros de bajo peso molecular (patrón de digestión tipo A) (Hörz y Zachau, 1977; Singer, 1982), mientras que otras apenas digieren dentro del satélite y por tanto originan multímeros de alto peso molecular (patrón de digestión tipo B).

Esta mayor variación entre las unidades que forman el satélite Dra I podría indicar que esta familia es más antigua que la familia Eco RI y por tanto ha ido acumulando mayor divergencia entre sus unidades. Por otro lado, sabemos que las distintas unidades de ADN satélite evolucionan de forma concertada, es decir, existen una serie de mecanismos como intercambios desiguales o conversión génica capaces de homogeneizar la secuencia de los miembros de un ADN satélite (Dover, 1982). Por tanto, estas diferencias en el grado de conservación de las unidades de ambos satélites podrían reflejar también diferencias en la tasa de homogeneización de ambas familias de ADN repetido.

B) La Familia Hind III

Los resultados obtenidos en la hibridación en Southern-blot con el monómero de pCch32 (Fig. 11) indican que la familia Hind III puede tener dos formas diferentes de organización. Como en los otros dos ADNs satélites, las digestiones con algunas endonucleasas demuestran que las unidades repetidas de la familia Hind III se organizan en

tándem pero no todas son idénticas. Los patrones de hibridación en escalera observados tras digerir el ADN con Dra I, Rsa I o Hinf I son indicativos de estas variaciones entre los miembros de la familia. Sin embargo, el patrón de digestión observado con Eco RI, enzima que no posee dianas de restricción dentro del monómero de pCCH32, es inusual en el caso de ADNs satélite formados por unidades que se agrupan en largos tándemes. En estas digestiones, la mayor parte del satélite permanece sin digerir (Fig. 11A), como se esperaría si éste se organizara únicamente en largos clusters. Sin embargo, los fragmentos de restricción que aparecen con Eco RI, y que no son múltiplos de la unidad básica de repetición (Fig. 11B), se deben seguramente a los dos aspectos siguientes. Primero, parte del ADN satélite Hind III estaría formado por clusters con un número variable de unidades repetidas de 160 pb, las cuales se encontrarían dispersas en el genoma. Segundo, flanqueando estos clusters debe de existir una secuencia repetida con sitios de restricción para Eco RI. Si estos clusters dispersos se organizaran junto a secuencias de copia única, se esperaría que las enzimas que cortan en las secuencias que flanquean los clusters originen fragmentos de restricción con longitud muy variable, lo que daría lugar a un patrón de hibridación heterodisperso formado por fragmentos de muy distinto tamaño. Sin embargo, el hecho de que Eco RI origine fragmentos de restricción discretos está de acuerdo con la presencia de sitios Eco RI en una secuencia repetida común localizada a ambos lados de cada cluster. Este tipo de organización se ha encontrado también en una familia de ADN repetido de *Xenopus laevis* formada por unidades de 388 pb que se agrupan en tándem formando pequeños clusters de tamaño variable (Lam y Carroll, 1983).

Por tanto, aunque la mayor parte de las unidades de este satélite se organizan en tándem formando largos clusters, otras formarían agrupaciones en tándem de menor tamaño que estarían dispersas en distintos sitios del genoma. Estas dos formas de organización podrían estar en relación con la localización cromosómica de esta familia. De hecho, aunque la mayor parte del satélite se

localiza en la heterocromatina paracentromérica del tercer par cromosómico, la hibridación *in situ* muestra también la presencia de unidades del satélite dispersas por el brazo largo de este mismo cromosoma (Fig. 12).

Este tipo de organización es bastante inusual puesto que, normalmente, el ADN satélite se organiza en largos clusters asociados con la heterocromatina (John, 1988). En algunos casos excepcionales, se han encontrado secuencias repetidas en tándem que se encuentran dispersas por todo el genoma o en un cromosoma concreto tal y como ocurre en algunos ADNs satélite de anfibios (Batistoni *et al.*, 1986; Vignali *et al.*, 1991). Sin embargo, nunca se han encontrado familias de ADN repetido en tándem, que estén a la vez organizadas en clusters dentro de la heterocromatina y dispersas en otros sitios cromosómicos.

Teniendo en cuenta que la familia Hind III, como otras familias de ADN heterocromático, se organiza en tándem en la heterocromatina paracentromérica del cromosoma NOR, es probable que los miembros de esta familia se hayan amplificado en la región heterocromática y posteriormente se hayan distribuido a lo largo de cromosoma NOR mediante mecanismos tales como los intercambios desiguales. La acumulación preferencial de clusters dispersos de ADN repetido en tándem en el cromosoma 1 de algunas especies de *Triturus* se ha explicado también como consecuencia de intercambios desiguales (Macgregor *et al.*, 1983; Sims *et al.*, 1984; Vignali *et al.*, 1991). Este mecanismo sería también capaz de aumentar o disminuir el número de unidades dentro de un cluster originando el polimorfismo que hemos observado para la longitud de los fragmentos de restricción originados por Eco RI en distintos individuos de *C. capillaris* (Fig. 11B).

La amplificación de ADN satélite de los centrómeros o los telómeros seguida de una dispersión progresiva de las secuencias a otras regiones del genoma, es un mecanismo que han propuesto Macgregor y Sessions (1986a, b) para explicar la evolución del ADN satélite en

el género *Triturus*. En este mismo sentido, Anderson *et al.* (1981) propusieron que el ADN disperso puede tener su origen en la amplificación y dispersión de bloques de ADN repetido organizado en tándem. De acuerdo con estos modelos, la familia Hind III estaría en un estadio temprano de expansión y dispersión en el genoma de *C. capillaris*, por lo que todavía es posible observar ambos tipos de organización.

5.1.3 DISTRIBUCION CROMOSOMICA DEL ADN SATELITE

En *C. capillaris*, al igual que ocurre en muchas especies animales y vegetales (John, 1988), la heterocromatina constitutiva se localiza en los cromosomas siguiendo el modelo de "distribución equilocal de la heterocromatina" propuesto por Heitz (1935); es decir, las bandas C de cromosomas no homólogos se localizan a una distancia similar respecto del centrómero (Figs. 6A y 6E). No obstante, algunas de las bandas C tienen una posición más cercana al centrómero que otras.

El análisis de la distribución del ADN satélite de *C. capillaris* mediante hibridación *in situ* indica que mientras la familia Eco RI se distribuye sobre las bandas de heterocromatina C más próximas al centrómero, la familia Dra I se distribuye en todas las bandas C del cariotipo (proximales y distales), excepto en las asociadas a los NORs (Fig. 6E). La familia Hind III, en cambio, tiene una distribución mucho más específica localizándose únicamente en el tercer par cromosómico o cromosoma NOR (Fig. 12).

Esta distribución específica de cada familia en el genoma puede reflejar los mecanismos por los cuales el ADN repetido se ha amplificado y distribuido entre los distintos cromosomas de una especie (Flavell, 1982b; Schweizer y Loidl, 1987). Teniendo en cuenta que la heterocromatina constitutiva se localiza principalmente en los

centrómeros y en los telómeros de los cromosomas, Schweizer y Loidl (1987) han propuesto que los centrómeros y los telómeros de los cromosomas son sitios en donde se produce la amplificación y posterior dispersión de secuencias heterocromáticas entre regiones equilocales. Esta transferencia de material heterocromático entre regiones equilocales se vería facilitada si los centrómeros de los cromosomas se mantienen polarizados durante la interfase (orientación Rabl; Rabl, 1885), de forma que las regiones equilocales de distintos cromosomas homólogos se mantengan lo suficientemente próximas para intercambiar secuencias repetidas. De acuerdo con esta hipótesis y teniendo en cuenta que los cromosomas de *C. capillaris* mantienen una orientación Rabl durante la interfase mitótica (Oud *et al.*, 1989), es de esperar que la composición de las bandas C equilocales sea más similar que las de bandas C no equilocales. Nuestros datos demuestran efectivamente que las bandas C equilocales están compuestas por las mismas familias de ADN repetido. De hecho, las bandas terminales del cromosoma 2 y las bandas intersticiales que son equilocales con respecto a las primeras únicamente hibridan con la familia Dra I (Fig. 6E). En cambio, la banda C terminal de la primera pareja y las bandas intersticiales que son equilocales con ella, hibridan tanto con la familia Dra I como con la Eco RI (Fig. 6E)

Nuestros datos están parcialmente de acuerdo con las observaciones de John (1988) quien ha señalado que las bandas C proximales normalmente difieren en composición con respecto a las bandas C terminales. En *C. capillaris* ambos tipos de bandas son diferentes. De hecho, mientras que las bandas C más próximas al centrómero están formadas por los satélites Eco RI y Dra I, las bandas C más distales al centrómero únicamente hibridan con la familia Dra I. No obstante, y a diferencia de lo que ocurre en algunas especies de cetáceos (Arnason *et al.*, 1978) o en el saltamontes *Atractomorpha similis* (John *et al.*, 1986), en el caso de *C. capillaris* las bandas C distales y proximales no se han diferenciado totalmente puesto que al menos en las bandas proximales coexisten ambas familias.

La familia Hind III se localiza únicamente sobre uno de los cromosomas del cariotipo, el cromosoma NOR. De hecho, el monómero de la familia Hind III, pCCH32, hibrida sobre una banda C paracentromérica en el cromosoma NOR, así como a lo largo del brazo largo de este mismo par cromosómico. Dada la proximidad física de esta familia con el ADN ribosómico, podríamos pensar que ambas familias de ADN repetido están relacionadas. De hecho, dentro del espaciador intergénico del ADNr existen pequeñas secuencias repetidas en tándem, las cuales en algunas especies se han amplificado dando lugar a satélites independientes de la unidad de repetición del ADNr (Unfried *et al.*, 1991). Sin embargo, los patrones de hibridación en Southern-blot que muestran ambas familias de ADN repetido (la familia de ADNr y la familia Hind III) son completamente diferentes (Figs. 11 y 16). Además, nuestros datos de hibridación *in situ* indican que estas dos familias, aunque próximas en el cromosoma NOR, se organizan en clusters separados. En concreto, mientras que el ADNr hibrida sobre la constricción secundaria y sobre el satélite terminal del cromosoma NOR (Fig. 15), la familia Hind III lo hace sobre la heterocromatina paracentromérica (Fig. 12). Por tanto, el ADN satélite Hind III constituye una familia de ADN repetido específica del cromosoma NOR.

Schweizer y Loidl (1987) han propuesto que, dada la función que realizan algunos cromosomas especiales tales como los cromosomas sexuales o los cromosomas NORs, o la disposición especial que mantienen estos cromosomas en los núcleos interfásicos, el ADN repetido de éstos puede evolucionar diferencialmente con respecto al que presentan el resto de los cromosomas. Sin embargo, son pocos los casos en los que se ha demostrado la presencia de ADN repetido específico en los cromosomas NORs. Así, Barnes *et al.* (1985) observaron que el ADN satélite que hibrida con todas las bandas C teloméricas de *A. cepa* no hibrida, sin embargo, con los telómeros de los cromosomas NORs. Los cromosomas NORs humanos comparten también una subfamilia del ADN satélite alfa centromérico, así como otras familias

de ADN repetido (Jorgensen *et al.*, 1987; Kurnit *et al.*, 1986). En el caso de plantas, son muy pocos los casos en los que se ha demostrado la asociación específica de una familia de ADN altamente repetido con un único cromosoma (Bauwens *et al.*, 1991), y en ningún caso se han detectado secuencias repetidas específicas del cromosoma NOR. No obstante, el análisis de las bandas C de plantas mediante distintos fluorocromos ha puesto de manifiesto que mientras que las distintas bandas C de una especie pueden ser ricas en G+C o A+T, la heterocromatina asociada a los NORs es, en la mayoría de los casos, rica en G+C ya que reacciona siempre positivamente con el fluorocromo CMA₃ (Schweizer, 1980). Estas regiones de heterocromatina CMA⁺ asociadas al NOR pueden ser debidas a ADN ribosómico que permanece inactivo en forma de heterocromatina (Flavell, 1986b) o tratarse de ADN satélite rico en G+C (Schweizer, 1980). En *C. capillaris*, la banda C terminal asociada con el NOR y que reacciona de forma positiva con CMA₃ (Maluszynska, 1990) hibrida únicamente con ADNr (Fig. 15). Sin embargo, la banda C centromérica próxima al NOR hibrida específicamente con el ADN satélite Hind III (Fig. 12).

La asociación de los cromosomas NOR al mismo nucleolo puede hacer que éstos mantengan una disposición específica en el núcleo interfásico, lo que favorecería la diferenciación de la heterocromatina del cromosoma NOR. En el caso de *C. capillaris*, esta diferenciación solo ha afectado a la heterocromatina paracentromérica mas cercana al NOR, donde se localiza mayoritariamente la familia Hind III. En cambio, las dos bandas C intersticiales localizadas en el brazo largo de este mismo cromosoma tiene una composición similar al del resto de la heterocromatina del cariotipo (Fig. 6).

5.1.4. DISPOSICION DEL ADN SATELITE EN LOS NUCLEOS INTERFASICOS

Como hemos indicado anteriormente, aunque existen variaciones entre las unidades de los tres ADN_s satélite aislados de *C. capillaris*, éstas se mantienen bastante homogéneas. Es decir, las distintas secuencias de un mismo ADN satélite (incluso aquellas que se encuentran localizadas en distintos sitios cromosómicos) evolucionan de manera concertada. Esta evolución concertada entre los miembros de una familia de ADN repetido localizada en distintos cromosomas no homólogos implica la amplificación y distribución de una secuencia en distintos cromosomas como ya hemos indicado, pero también la actuación de ciertos mecanismos tales como intercambios desiguales o conversión génica capaces de homogeneizar la secuencia de los distintos miembros de la familia (Dover, 1982). Estos mecanismos de homogeneización requieren que las secuencias implicadas sean capaces de interactuar físicamente durante algún estadio del ciclo celular (Flavell, 1982b; Schweizer y Loidl, 1987). Por tanto, la homogeneización de una familia de ADN repetido localizada en varios cromosomas estará relacionada con la disposición de estos cromosomas en los núcleos interfásicos.

La disposición de los cromosomas de *C. capillaris* durante metafase, así como la asociación entre cromosomas homólogos, ha sido estudiada por varios autores. No obstante los datos obtenidos hasta el momento son contradictorios. Ferrer y Lacadena (1977) encontraron que los cromosomas 1 y 2 de *C. capillaris* tienden a asociarse durante metafase, y Oud *et al.* (1989) han observado que las tres parejas del cariotipo y en especial la pareja NOR muestra una preferencia para asociarse durante profase, metafase y anafase mitótica. Sin embargo, Rawlins y Shaw (1988) no encontraron ninguna evidencia que demostrara una disposición particular de los cromosomas, así como ninguna asociación entre cromosomas homólogos.

Nuestros datos de hibridación *in situ* con la secuencia de ADN específica del cromosoma NOR (pCch32) demuestran que al menos la

pareja NOR de *C. capillaris* tiende a asociarse con una alta frecuencia (50%) en los núcleos mitóticos (Fig. 12). Es posible que los dos cromosomas NORs estén asociados debido a que comparten un mismo nucleolo. De hecho, en los núcleos de las células meristemáticas de *C. capillaris* se observa normalmente un solo nucleolo (Nanninga *et al.*, 1992). Esta asociación de los cromosomas NORs podría facilitar la homogeneización de la familia definida por pCCH32, a la vez que determinar las diferencias entre la heterocromatina cercana al NOR y el resto de la heterocromatina del cariotipo.

Las familias Eco RI y Dra I, en cambio, no han mostrado ninguna evidencia de asociación en los núcleos mitóticos. Los clusters de ambos ADNs satélites se distribuyen en el núcleo formando diferentes cromocentros (Fig. 9). Además, los cromocentros que organizan ambas familias de ADN repetido ocupan sitios diferentes dentro del núcleo, lo que demuestra que en aquellas bandas C donde hibridan tanto el satélite Eco RI como el Dra I, las secuencias de éstos no están entremezcladas sino que se organizan en clusters completamente separados (Figs. 9A-C). Sin embargo, la hibridación simultánea de ambas familias (Eco RI y Dra I) en los núcleos de las células madres del polen, ha puesto de manifiesto que mientras los clusters de la familia Eco RI tienden a asociarse durante los estadios de leptotenezygotene para formar un gran cromocentro, los clusters de la familia Dra I no se asocian en ninguna etapa de la profase meiótica (Figs. 9D-F). Si los mecanismos responsables de la homogeneización del ADN heterocromático actúan principalmente en los núcleos meióticos como han sugerido Schwarzacher *et al.* (1884) y Schweizer y Loidl (1987), esta asociación diferencial de las familias Eco RI y Dra I durante la profase meiótica, podría explicar la mayor heterogeneidad existente entre las secuencias de las unidades del satélite Dra I respecto del satélite Eco RI. En este sentido, Jantsch *et al.* (1990) han demostrado que las unidades del ADN repetido que forman parte de la heterocromatina centromérica de los cromosomas acrocéntricos de *Sus scrofa*, la cual se mantiene asociada durante la primeros estadios de

la meiosis, son más homogéneas que las que se localizan en la heterocromatina centromérica de los cromosomas metacéntricos, la cual no se asocia durante la meiosis.

Aunque, la heterocromatina de algunas especies suele asociarse durante la primera profase meiótica (John, 1988), sin embargo, se desconocen los factores que afectan dicha asociación entre cromosomas no homólogos. La polarización de los telómeros de cromosomas no homólogos ("bouquet polarisation") podría explicar la asociación de la heterocromatina cercana a los telómeros en algunas especies (Schwarzacher *et al.*, 1984; Jamilena *et al.*, 1990; Jantsch, 1990). No obstante, en *C. capillaris*, la asociación de los clusters de la familia Eco RI afecta tanto a bandas C terminales como a bandas C intersticiales. Además, aunque la familia Dra I se localiza muy próxima a la familia Eco RI en algunas bandas C, sin embargo, los clusters de la primera familia no se asocian. Por tanto, es posible que la asociación de la heterocromatina durante la meiosis no solamente se deba a factores físicos que mantengan una estructura espacial determinada en el núcleo, sino que también pueda depender del ADN repetido que forma parte de la misma, de forma que la asociación solamente ocurra entre regiones de ADN satélite muy homogéneas.

5.2. EL ADN RIBOSOMICO DE *Crepis capillaris*

5.2.1. EL ADN RIBOSOMICO 18S, 5.8S Y 25S

Nuestros datos de hibridación *in situ* utilizando como sonda el ADN ribosómico 18S, 5.8S y 25S de trigo (pTA71) coinciden con los obtenidos por Maluszynska y Schweizer (1989), aunque estos autores utilizaron como sonda el ADNr de *Curbubita pepo*. En el genoma estándar de *C. capillaris*, el ADNr se localiza en la región terminal del brazo corto del tercer par cromosómico, tanto a nivel de la constricción secundaria como sobre el satélite heterocromático terminal asociado a

la misma (Fig. 15). Sin embargo, la tinción con plata de los cromosomas de *C. capillaris* solo pone de manifiesto la presencia de un NOR en la constricción secundaria de este cromosoma (Maluszynska y Schweizer, 1989). Si tenemos en cuenta que la tinción con plata únicamente tiñe el ADN_r transcripcionalmente activo (Miller *et al.*, 1976), cabe pensar que los cistrones ribosómicos que se localizan en el satélite heterocromático terminal se encuentran inactivos. La presencia de ADN_r heterocromático en las proximidades del NOR ha sido demostrada también en maíz (Givens y Phillips, 1976). Flavell (1986b) ha propuesto que dado el exceso de genes para el ARN_r existentes en plantas, la mayor parte de ellos se encuentran inactivos en forma de heterocromatina en las proximidades del NOR. Esto explicaría la tinción específica de estas regiones heterocromáticas asociadas al NOR con el fluorocromo CMA₃ en la mayor parte de las especies (Schweizer, 1980)

Sin embargo, en otros casos se ha demostrado que la heterocromatina asociada al NOR puede estar formada por otras secuencias de ADN repetido. Así, en los cromosomas acrocéntricos humanos el satélite heterocromático terminal asociado a la constricción secundaria (donde se localiza el NOR) está formado por secuencias repetidas de ADN satélite beta (Waye y Willard, 1989), mientras que la heterocromatina paracentromérica próxima al NOR hibrida con secuencias repetidas de ADN satélite alfa (Jorgensen *et al.*, 1987). En *C. capillaris*, aunque la banda heterocromática terminal asociada al NOR hibrida con ADN_r, en cambio la heterocromatina paracentromérica cercana al NOR está formada por una familia específica de ADN satélite, la Familia Hind III (Fig. 12).

Mediante hibridación *in situ* hemos detectado también la presencia de ADN_r en los cromosomas Bs de *C. capillaris* (Fig. 15). Dado que la sonda de ADN_r utilizada por Maluszynska y Schweizer (1989) y la utilizada por nosotros han sido diferentes, es poco probable que la señal de hibridación con ADN_r en los cromosomas Bs se deba a los

espaciadores intergénicos de los genes ribosómicos, ya que estas regiones son muy variables entre diferentes especies de plantas (Rogers y Bendich, 1987). Por tanto, esta hibridación refleja la presencia de verdaderos genes de ADNr en los cromosomas accesorios de esta especie. No obstante, la actividad transcripcional de estos genes en los cromosomas Bs no está muy clara. Utilizando material procedente de poblaciones suizas, Maluzynska y Schweizer (1989) observaron que el ADNr de los Bs reacciona positivamente a la tinción con plata, lo que indicaría que los genes ribosómicos de los Bs son activos. Sin embargo, en plantas procedentes de poblaciones naturales de Gran Bretaña, aunque se sabe que los Bs poseen también genes de ADNr, éstos no presentan actividad NOR (Jones *et al.*, 1989).

Los resultados obtenidos en las hibridaciones ADN genómico de distintos individuos de *C. capillaris* con la sonda de ADNr heteróloga pTA71 demuestran que el ADNr 18S, 5.8S y 25S de esta especie se organiza en unidades repetidas de 8.8 y 9 Kb. La heterogeneidad en el tamaño de las unidades del ADNr es una característica común de los ADNs ribosómicos de animales (Long y Dawid, 1980) y plantas (Rogers y Bendich, 1987). En aquellos casos donde se ha llevado a cabo un análisis detallado, se ha observado que esta variabilidad está asociada con variaciones en el número de subrepeticiones internas dentro del espaciador intergénico (IGS). La longitud de estas unidades repetidas internas oscila entre 100 y 300 pb, y su secuencia es específica de cada especie (Appels y Dvorak, 1982; Ellis *et al.*, 1984; Yakura *et al.*, 1984; Saghai-Marrof *et al.*, 1984; McMullen *et al.*, 1986; Hemleben *et al.*, 1986; Tremousaygue *et al.*, 1988). En *C. capillaris* las diferencias en el tamaño de las unidades de ADNr se deben también a variaciones en el tamaño del IGS. De hecho, los fragmentos de restricción polimórficos que surgen tras digerir las unidades de 9 y 8.8 Kb (5.1 y 5.3 Kb en las digestiones con Eco RI, 3.7 y 3.9 Kb en las digestiones con Dra I y los fragmentos de 4.7 y 3.5 Kb y 4.5 y 3.3 Kb en la digestiones con Bam HI) se localizan en el IGS (Fig. 17). Además, si tenemos en cuenta que la variación en la

longitud de ambas unidades es de aproximadamente 200 pb, es posible pensar que estas dos unidades de ADNr se originan también como consecuencia de variaciones en el número de subrepeticiones existentes en el IGS.

En algunas especies, las diferentes unidades de ADNr definidas por su longitud se localizan en diferentes NORs (Saghai-Moroof *et al.*, 1984; Ellis *et al.*, 1984; Appels *et al.*, 1986; Delseny *et al.*, 1990). No obstante, se han encontrado variaciones en la longitud de las unidades de ADN dentro de un mismo NOR en el hombre y ratón (Krystal *et al.*, 1981), en *Vicia faba* (Rogers y Bendich, 1987) y en maíz (Rocheford *et al.*, 1990). En el genoma estándar de *C. capillaris* solo existe un cluster de ADNr en el tercer par cromosómico, por lo que las dos unidades de ADNr de 8.8 y 9 Kb detectadas en individuos sin Bs deben localizarse en este único locus.

La distribución de estas dos unidades de ADNr entre las diferentes plantas estudiadas no es la misma. Así, mientras diez de los individuos estudiados poseían los dos tipos de unidades repetidas, dos de ellos mostraron únicamente la unidad de 9 Kb. Además, el número de copias para las unidades de 8.8 Kb variaba de unos individuos a otros (Fig. 16). Estas variaciones en el número de unidades de 8.8 Kb no tienen relación con la presencia o ausencia de cromosomas Bs en los individuos analizados, ya que plantas sin cromosomas Bs también mostraban variaciones en el número de unidades de 8.8 Kb. Por tanto, aunque ciertas variaciones en el número de copias de ADNr puedan estar causadas en algunos individuos por la presencia de cromosomas Bs con ADNr, dentro del NOR del tercer par cromosómico también existen diferencias para el número de unidades de 8.8 Kb. Esta distribución desigual de las distintas unidades de ADNr entre diferentes individuos de una especie también se ha detectado en *Vicia faba* (Rogers *et al.*, 1986) y en *Clematis fremontii* (Learn y Schaal, 1987). Sin embargo, en otras plantas tales como la cebada (Saghai-Marooof *et al.*, 1984), el trigo (Appels y Dvorak, 1982) o *Cucurbita maxima* (Kelly *et al.*, 1990)

las distintas unidades de ADNr se distribuyen de forma homogénea entre los individuos de una misma variedad aunque esta distribución difiere de unas variedades a otras.

La presencia de estas dos unidades de ADNr en el tercer par cromosómico de *C. capillaris* podría tener dos explicaciones diferentes. Las repeticiones de 8.8 y 9 Kb se han podido originar en el NOR del tercer par cromosómico a través de intercambios desiguales entre la subrepeticiones internas del IGS. Una vez que aparece la unidad de repetición nueva dentro del clusters, mecanismos tales como intercambios desiguales o conversión génica pueden hacer que estas unidades fluctuen en número hasta que una de ellas llegue a fijarse dentro de la población (Dover, 1986). No obstante, el hecho que las variaciones en el número de copias afecten en mayor grado a las unidades de 8.8 Kb que a las de 9 Kb podría indicar que existen otros mecanismos no estocásticos implicados en la organización y evolución de las distintas unidades de ADNr en *C. capillaris*. Por otro lado, se ha observado que las unidades de 8.8 Kb aparecen en todos los individuos con cromosomas Bs analizados, mientras que los dos únicos individuos que únicamente presentan la unidad de 9 Kb no poseen cromosomas Bs. Estos datos podrían indicar que las unidades de 8.8 Kb se han podido originar en el ADNr de los cromosomas Bs y posteriormente se han transferido al NOR del cromosoma 3 mediante recombinación entre ambas zonas. La existencia de variaciones en la longitud de las unidades de ADNr dentro de un mismo NOR en el guisante (Ellis *et al.*, 1984) y en humanos (Arnheim *et al.*, 1980) se ha explicado también como consecuencia de intercambios de ADNr entre distintos NORs con unidades de ADNr diferentes en su longitud.

Además de estas variaciones en la longitud de las unidades, todos los individuos analizados mostraron dos unidades diferentes de ADNr en cuanto a las dianas de restricción para Bam HI. Así, algunas unidades de ADNr poseen 3 dianas para Bam HI, mientras que otras poseen un sitio adicional Bam HI en la región que codifica para el ARN

25S (Fig. 17). Esta variación afecta tanto a las unidades de 8.8 Kb como a las de 9 Kb. Variaciones que afectan a este sitio de restricción Bam HI en el gen 25S se han detectado también en el ADNr de centeno, cebada y trigo (Gerlach y Bedbrook, 1979; Appels *et al.*, 1980), en el ADNr de *Allium cepa* y *Scilla peruviana* (Maggini y Carmona, 1981; Carmona *et al.*, 1984), en el ADNr de *Allium sphaerocephalon* (Garrido Ramos *et al.*, 1992) y en distintas especies de la tribu *Cynareae* (*Compositae*) (Tucci y Maggini, 1986). Esta variabilidad puede deberse a cambios en la secuencia de unas unidades con respecto a otras, pero es más probable que se deban a la metilación de la citosina interna de la diana Bam HI (Gerlach y Bedbrook, 1979).

El patrón de digestión del ADNr de *C. capillaris* con Msp I y Hpa II indica que las citosinas internas de la mayor parte de los sitios CCGG dentro del ADNr se encuentran metiladas. De hecho, mientras que Msp I digiere el ADNr originando fragmentos de restricción de muy distinto tamaño, Hpa II apenas corta dentro de las unidades de ADNr originando un patrón de digestión en el que la mayor parte del ADNr permanece sin digerir y la otra parte del mismo se corta originando fragmentos de restricción de alto peso molecular (Fig. 16). El gran número de fragmentos de restricción originados por Msp I indicaría también que parte de las unidades son total o parcialmente resistentes a la digestión con Msp I, lo que podría deberse a una metilación en la citosina externa de los sitios de reconocimiento CCGG. Similares niveles de metilación se han encontrado en el ADNr de trigo y guisante (Watson *et al.*, 1987; Flavell *et al.*, 1988). Si como se ha sugerido (Flavell *et al.*, 1988) la expresión de los genes de ARNr está relacionada con la desmetilación de ciertos residuos de citosina específicos en el ADNr, el patrón de digestión del ADNr de *C. capillaris* con Hpa II indicaría que la mayor parte de los genes de ARNr de esta especie se encuentran inactivos. Esto estaría de acuerdo con nuestros datos de hibridación *in situ*, los cuales demuestran que

parte del ADNr de *C. capillaris* aparece inactivado en forma de heterocromatina en el satélite terminal asociado al NOR (Fig. 15).

5.2.2. EL ADN RIBOSOMICO 5S

El ADN 5S de *C. capillaris* mantiene una localización próxima al ADNr en el tercer par cromosómico. La hibridación *in situ* demuestra que el ADN 5S se localiza entre la constricción secundaria (ocupada por ADNr) y el centrómero (Fig. 15). Esta localización del ADN 5S cercana al centrómero es poco frecuente en plantas habiéndose encontrado únicamente en tomate (Lapitan *et al.*, 1991). En otras plantas como cebada, trigo, centeno, maíz o guisante, el ADN 5S muestra una localización telomérica o subtelomérica (Appels *et al.*, 1980; Mascia *et al.*, 1981; Ellis *et al.*, 1988). Por otro lado, la presencia de ADN 5S en el cromosoma NOR se ha encontrado también en algunas especies de cereales tales como centeno, trigo y cebada (Appels *et al.*, 1980). En centeno, al igual que ocurre en *C. capillaris*, el ADN 5S aparece localizado en las proximidades del NOR, en el cromosoma 1R (Reddy y Appels, 1989; Braum y Appels, 1991). Sin embargo, en la mayor parte de las especies los genes que codifican para el ARN 5S poseen una localización cromosómica distinta de los que codifican para el ARN 18S, 5.8S y 25S (Mascia *et al.*, 1981; Ellis *et al.*, 1988; Lapitan *et al.*, 1991).

Los patrones de hibridación en Southern-blot obtenidos tras hibridar el ADN genómico de *C. capillaris* digerido con distintas enzimas de restricción con las sondas pTA71 y cP5S son completamente diferentes (Figs. 16 y 19). Esto indica que el ADNr y el ADN 5S de *C. capillaris*, aunque muy próximos en su localización cromosómica, se organizan en diferentes unidades repetidas que se agrupan formando clusters separados. Únicamente en algunos eucariotas inferiores tales como la levadura (Rubin y Sulston, 1973) o en *Dictyostelium* (Maizels, 1976), los genes de ARN 5S están ligados a las unidades repetidas de ADNr 18S, 5.8S y 25S.

A la vista de las hibridaciones de ADN genómico con la sonda de ADN 5S de guisante se puede concluir que el ADN 5S de *C. capillaris* está formado por unidades repetidas en tándem de aproximadamente 350 pb. El tamaño de las unidades de repetición es comparable con el obtenido en otras especies de plantas (Lapitan *et al.*, 1991).

Aunque no se han detectado variaciones en el tamaño de las unidades de repetición, sin embargo, el análisis del ADN ribosómico 5S pone de manifiesto ciertas variaciones entre las secuencias de las distintas unidades de la familia. De hecho, el patrón de hibridación en Southern-blot del ADN genómico de *C. capillaris* digerido con diferentes enzimas de restricción e hibridado con la sonda heteróloga cP5S recuerda los patrones en escalera obtenidos con el ADN satélite. No obstante, el nivel de variación que muestra el ADN 5S es menor que el detectado en el ADN satélite. Rsa I y Nde I detectan una variación aleatoria entre las unidades del tándem originando un patrón de digestión de tipo A o B (Hörz y Zachau, 1977). El resto de las enzimas o bien no cortan el ADN 5S, o como en el caso de Hae III lo digieren en unidades que corresponden al monómero (Fig. 19). Resultados similares se han obtenido con el ADN 5S de otras plantas (Ellis *et al.*, 1988; Gottlob-Mchugh *et al.*, 1990; Lapitan *et al.*, 1991). Además de esta variación aleatoria, las digestiones con Dra I ponen de manifiesto una variación que afecta a unidades agrupadas en tándem. Así, aunque la mayoría de las unidades carecen de sitios de reconocimiento para esta enzima, parte del ADN 5S se digiere en fragmentos correspondientes con el monómero (Fig. 19). Estas variaciones son independientes de la presencia o ausencia de cromosomas Bs en los individuos analizados.

Los resultados obtenidos tras digerir el ADN con las enzimas Msp I y Hpa II e hibridar con cP5S sugieren que las citosinas de los sitios CCGG dentro del ADN 5S están bastante metiladas. Hpa II no fue capaz de digerir dentro del ADN 5S, mientras que la digestión con Msp

I originaba un patrón en escalera en el que la mayor parte de los fragmentos eran múltiplos del monómero de 350 pb. Msp I originaba también otros fragmentos que no son múltiplos de la unidad de 350 pb. Estos últimos fragmentos seguramente se deben a la existencia de más de una diana Msp I en los monómeros de ADN 5S. Estos datos indicarían que las citosinas internas de todos los sitios CCGG se encuentran metiladas (se cortan con Msp I pero no con Hpa II), mientras que la metilación de las citosinas internas varía de unos sitios a otros originando el patrón de digestión que se observa con Msp I. Similares niveles de metilación se han encontrado dentro del ADN 5S de *Glycine max* (GottlobMchugh *et al.*, 1990), el guisante (Ellis *et al.*, 1988) y en el lino (Goldsbrough *et al.*, 1982)

5.3. ANALISIS COMPARATIVO DEL ADN DE LOS CROMOSOMAS A Y B: ORIGEN Y EVOLUCION DE LOS CROMOSOMAS Bs DE C. capillaris

En el presente trabajo se ha tratado de determinar la existencia de secuencias de ADN específicas de los cromosomas Bs de *C. capillaris*. En primer lugar, y con el propósito de identificar secuencias repetidas en estos cromosomas, se comparó el ADN de plantas con y sin cromosomas Bs digerido con diferentes enzimas de restricción y separado mediante electroforesis en geles de agarosa. Cada enzima de restricción originaba una serie de bandas específicas, las cuales contienen secuencias de ADN repetido (Flavell, 1982a). Sin embargo, el ADN de plantas con Bs y plantas sin Bs mostraron siempre el mismo patrón de bandas (Fig. 2). Puesto que se han utilizado un total de 18 enzimas de restricción, estos datos podrían indicar que si los cromosomas Bs de *C. capillaris* poseen secuencias de ADN repetido, éstas deben ser muy similares a las que existen en el genoma estándar de la especie. No obstante es también probable que no se haya utilizado la enzima de restricción idónea para poner de manifiesto el ADN repetido específico de estos cromosomas. En este sentido cabe

señalar que en centeno, aunque Lima de Faria *et al.* (1983) observaron que el patrón de bandas de ADN repetido que mostraba el ADN de plantas con y sin Bs tras ser digerido con cuatro enzimas de restricción era similar, posteriormente, Sandery *et al.* (1990) han puesto de manifiesto que la digestión con Dra I del ADN de plantas con Bs origina una banda de de 1.1 Kb que se corresponde con ADN repetido específico de los Bs.

Sin embargo, en el caso de *C. capillaris*, esta última hipótesis es menos probable, ya que se han utilizado un gran número de enzimas de restricción. Además los intentos por clonar ADN específico de los cromosomas Bs de esta especie mediante la técnica de hibridación substractiva F-PERT han sido también negativos. En este sentido, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por John *et al.* (1991). Utilizando la misma técnica (F-PERT), estos autores lograron identificar una familia de ADN repetido específica de los cromosomas Bs de *Brachycome dichromosomatica*, pero no lograron identificar ningún clon con ADN repetido específico de los Bs de *C. capillaris*. Tras hibridar el ADN de los clones recombinantes obtenidos mediante F-PERT con ADN total de *C. capillaris*, nosotros tampoco hemos logrado identificar ninguna secuencia repetida específica de los cromosomas Bs. Además, cuando el ADN de estos clones se utilizó para hibridar en Southern-blot con el ADN de plantas con Bs y ADN de plantas sin Bs, solo uno de los clones (pCc21) mostró ciertos fragmentos de restricción Sac I o Eco RI específicos del ADN de los Bs (Fig. 3). Estos datos indicarían en principio que el ADN de los Bs y en especial el ADN repetido que puedan tener estos cromosomas debe ser muy similar al que se encuentra en los cromosomas normales de la especie.

Puesto que el clon pCc21 contiene una secuencia rica en dinucleótidos CA, es posible pensar que esta secuencia es capaz de hibridar con otras regiones ricas en CA presentes tanto en el genoma estándar como en los Bs de *C. capillaris*. Otros experimentos de hibridación con sondas sintéticas de $(GT)_n/(CA)_n$ han demostrado que

esta secuencia se encuentra ampliamente distribuida en el genoma de muchos eucariotas (Hamada *et al.*, 1982; Rogers, 1983; Huijser *et al.*, 1987; Condit y Hubbell, 1991; Lönn *et al.*, 1992). Estas y otras secuencias simples de ADN repetido o "microsatélites" muestran las características típicas de los "minisatélites" humanos (Jeffreys *et al.*, 1985). Están formadas por motivos cortos que se organizan en tándem formando pequeños clusters, y muestran un alto nivel de variabilidad interindividual cuando se utilizan como sonda en hibridaciones en Southern-blot (Tautz, 1989; Weising *et al.*, 1992). Cuando el ADN de *C. capillaris* se digiere con enzimas de restricción y se utiliza para hibridar en Southern-blot con la secuencia rica en CA de pCc21 se observa un patrón de hibridación formado por fragmentos de longitud muy variable a lo largo de todo el recorrido del gel. Este patrón de hibridación indica que, al igual que ocurre en el genoma de animales (Hamada *et al.*, 1982), las regiones ricas en CA se distribuyen al azar en el genoma de esta especie. Sin embargo, las bandas de hibridación discretas que aparecen en estas mismas digestiones sugieren la existencia de regiones homólogas a los lados de cada cluster de $(CA)_n$. Las digestiones parciales de ADN de *C. capillaris* con Mbo I (Fig. 3) indican además que la longitud de estas regiones CA en el genoma de *C. capillaris* deben ser bastante pequeñas. En aquellos casos en donde se han secuenciado varias regiones ricas en CA del genoma de algunas plantas tales como *Piper reticulatum* y *Virola sebifera* se ha observado que estas regiones son también bastante pequeñas oscilando entre 16-22 pb (Condit y Hubbell, 1991).

Recientemente, se ha puesto de manifiesto que las sondas sintéticas de $(TG)_n$ o $(AC)_n$ son capaces de detectar variaciones interindividuales en hibridaciones en Southern-blot con ADN genómico de plantas (Lönn *et al.*, 1992; Weising *et al.*, 1992). Sin embargo, en *C. capillaris* la secuencia de pCc21 únicamente pone de manifiesto ciertas variaciones entre las regiones ricas en CA de los cromosomas A y B, pero no entre diferentes individuos. Esta diferenciación de las regiones CA entre los cromosomas A y B puede estar asociada a una

variación en la longitud o a diferencias en la organización de estas regiones en ambos tipos de cromosomas. Por otro lado, es posible que la secuencia clonada en pCc21 forme parte de un elemento de ADN disperso de mayor tamaño que haya sufrido alguna diferenciación de unos cromosomas a otros.

Si los cromosomas Bs de *C. capillaris* carecen de ADN repetido específico como hemos indicado anteriormente, cabría esperar que alguna de las tres familias que mayoritariamente forman parte de la heterocromatina constitutiva de los cromosomas As de *C. capillaris* (la familia Eco RI, Dra I y Hind III) también se encuentren en la heterocromatina paracentromérica de los Bs. Sin embargo, nuestros datos de hibridación *in situ* demuestran claramente que los Bs no hibridan con ninguna de estas familias. Estos datos contrastan con los obtenidos en otras especies en donde la hibridación *in situ* con sondas de ADN satélite ha puesto de manifiesto que la heterocromatina de los cromosomas A y B puede estar formada por las mismas familias de ADN satélite. Así, en el maíz, la heterocromatina de los knobs de los cromosomas As y la heterocromatina paracentromérica del B comparten una misma familia de ADN satélite (Peacock *et al.*, 1981). Lo mismo ocurre con algunas de las regiones heterocromáticas de los cromosomas A y B de *Glossina* (Amos y Dover, 1981) o de *Atractomorpha similis* (John *et al.*, 1986). Sin embargo, en estos casos, otras regiones de heterocromatina tanto de los As como de los Bs no hibridan con dichos ADNs satélites, lo que indicaría que estas regiones heterocromáticas están formadas por una o varias familias diferentes de ADN repetido. Sin embargo, la heterocromatina de los cromosomas As de *C. capillaris* está mayoritariamente formada por los ADNs satélite Eco RI, Dra I o Hind III. Por tanto, la ausencia de estas tres familias en la heterocromatina de los cromosomas Bs, y los datos mencionados antes, podrían indicar que el cromosoma B de *C. capillaris* carece o posee muy pocas secuencias de ADN satélite. En algunos sistemas con cromosomas Bs donde se ha llevado a cabo un análisis molecular detallado de la heterocromatina, todavía no se ha determinado el ADN repetido que

forma parte de las bandas C de los Bs. Así, en el centeno, el cDNA obtenido a partir del ADN altamente repetido de plantas sin Bs hibrida con la heterocromatina de los cromosomas As pero no con la de los Bs (Appels *et al.*, 1978). Además, ninguna de las secuencias repetidas aisladas de los cromosomas As del centeno, hibrida con el cromosoma B de esta especie (Jones y Flavell, 1982). Hasta el momento, solo se ha detectado una secuencia de ADN repetido específica de los Bs del centeno (Sandery *et al.*, 1990), pero se desconoce su localización cromosómica.

Por otro lado, los resultados obtenidos mediante hibridación *in situ* con ADN genómico (GISH) de plantas con y sin cromosomas Bs confirman: a) que el ADN de los cromosomas Bs es muy similar al que se encuentra en los cromosomas normales; y b) que los cromosomas Bs de *C. capillaris* carecen de ADN altamente repetido. De hecho, cuando el ADN de plantas sin Bs se utiliza para hibridar *in situ* se observa que los cromosomas A y B muestran la misma señal de hibridación. Teniendo en cuenta que las condiciones de hibridación utilizadas permiten la hibridación entre secuencias con al menos un 80% de homología (Schwarzacher *et al.*, 1989), la hibridación *in situ* del cromosoma B con ADN de plantas sin Bs confirma la similitud entre el ADN de los Bs y el que se encuentra en los cromosomas As. Además, cuando el ADN marcado de plantas con Bs se bloqueó con una gran cantidad de ADN sin marcar de plantas sin Bs las señales de la hibridación tanto en los As como en los Bs eran muy pobres. El hecho de que el ADN de individuos sin Bs sea capaz de bloquear la hibridación de todo el ADN procedente de plantas con Bs, volvía a indicar la homología entre el ADN de ambos tipos de cromosomas.

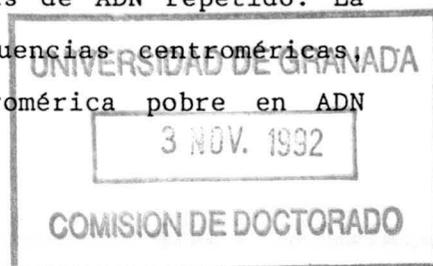
Además, puesto que en las sondas de ADN genómico las secuencias de ADN altamente repetido se encuentran en mayor proporción que las de ADN de secuencia única, es de esperar que las regiones heterocromáticas (ricas en secuencias repetidas) hibriden de forma más intensa que las regiones eucromáticas. De hecho, tanto en la

hibridaciones en las que se utilizó como sonda el ADN de plantas sin Bs como en las que se utilizó ADN de plantas con Bs, la heterocromatina de los cromosomas As, la cual sabemos que está formada por ADN altamente repetido, hibridaba de forma más intensa que la eucromatina. Sin embargo, la heterocromatina paracentromérica de los Bs no mostró ninguna diferencia respecto de la eucromatina. Además, si el ADN de plantas con Bs se enriquecía en secuencias repetidas específicas de *C. capillaris* (bloqueándolo con un exceso de ADN de otras especies del género *Crepis*) y se hibridaba *in situ* sobre cromosomas de *C. capillaris* con Bs, los resultados eran similares. La heterocromatina de los As hibridaba fuertemente con la sonda pero la heterocromatina del B mostraba la misma hibridación que la eucromatina. Por tanto, todos los datos parecen indicar que la heterocromatina de los cromosomas Bs de esta especie no está especialmente enriquecida en secuencias de ADN altamente repetido.

Esta conclusión puede ser bastante extraña si tenemos en cuenta que la heterocromatina constitutiva está formada mayoritariamente por secuencias de ADN altamente repetido (John, 1988). Aunque, por ejemplo, en algunas bandas C del genoma humano no se ha detectado aún ninguna secuencia de ADN repetido, se desconoce si esta ausencia es real o si por el contrario se debe a un desconocimiento del ADN repetido que forma parte de las mismas (Sumner, 1990). Sin embargo, en el caso de *C. capillaris*, todos los datos parecen indicar que la heterocromatina de los cromosomas Bs carece de ADN altamente repetido. Es posible pensar que la cromatina que forma parte de la región paracentromérica del B de *C. capillaris* ha sufrido un cambio en su organización, de forma que, aunque carece de secuencia repetidas, muestra un patrón de organización similar a la heterocromatina. En este sentido, cabe destacar que los cromosomas Bs de *C. capillaris*, aunque aparentemente heterocromáticos en casi un tercio de su longitud, carecen de algunas de las características típicas de los otros cromosomas Bs heterocromáticos. Así, la síntesis del ADN de los Bs de *C. capillaris* ocurre durante todo el periodo S, mientras que en

otros Bs parcial o totalmente heterocromáticos como los del maíz, esta síntesis tiene lugar durante la última mitad de periodo S (Abraham *et al.*, 1968). Además, y a pesar de que los Bs de *C. capillaris* muestran una banda grande de heterocromatina, su contenido de ADN por unidad de longitud es menor que en los cromosomas As (Maluszynska, 1990). En cambio, en los Bs heterocromáticos de otras especies tales como el centeno o el maíz, la cantidad de ADN por unidad de longitud es mayor en los Bs que en los As (Ayonoadu y Rees, 1964; Jones y Rees, 1968). Todos estos hechos sugieren que la cromatina de los Bs de *C. capillaris* posee una conformación especial, posiblemente eucromática y sin DNA altamente repetido en su origen pero heterocromatinizada constitutivamente, al menos en la región pericentromérica. Previamente se ha sugerido que la inactivación de otras regiones cromosómicas puede ser consecuencia de un proceso de heterocromatinización. Tal es el caso de los centromeros adicionales en los cromosomas dicéntricos (Earnshaw y Migeon, 1985) o la inactivación (variegación) que sufren aquellos genes que se han translocado cerca de la heterocromatina centromérica de *Drosophila* (Zhimulev *et al.*, 1986). Por tanto, la heterocromatinización puede ser un mecanismo capaz de cambiar rápidamente la organización del ADN de los Bs impidiendo de esta forma el apareamiento de los Bs con los cromosomas As de los que se originaron y suprimiendo la actividad génica en estos cromosomas (Jones y Rees, 1982). Además, si este proceso es capaz de ajustar la dosis génica en los individuos con Bs, no sería necesario una diferenciación y degeneración de las secuencias del B tal y como ha propuesto Green (1990). De hecho, en *C. capillaris*, el ADN de los cromosomas Bs mantiene una gran homología con el que presenta el genoma estándar del cual posiblemente se originó.

A la vista de estos resultados es posible pensar que los cromosomas Bs de *C. capillaris* se han originado a partir de una región de uno de los cromosomas As pobre en secuencias de ADN repetido. La necesidad de que este fragmento contenga secuencias centroméricas, relaciona su origen con una región paracentromérica pobre en ADN



satélite. Esto podría excluir a la región pericentromérica del tercer par cromosómico o cromosoma NOR, ya que esta región está formada por una familia de ADN repetido específica (la familia Hind III), la cual no muestra ninguna homología con la región pericentromérica del B (Fig. 12). Pero, precisamente, Maluszynska y Schweizer (1989) han propuesto que, dado que el cromosoma B de *C. capillaris* contiene secuencias de ADN ribosómico, éste podría haberse originado a partir del brazo corto del cromosoma NOR. Sin embargo, el hecho de que el ADN ribosómico 5S se localice en el brazo corto del tercer par cromosómico entre el ADN ribosómico 18S + 25S y el centrómero pero no en los cromosomas Bs (Fig. 15), pone seriamente en duda la hipótesis de que los Bs de esta especie se hayan originado completamente a partir del brazo corto del tercer par cromosómico, al menos de una forma simple. De hecho, si los cromosomas B proceden de esta región, el ADN ribosómico 5S debería haberse delecionado posteriormente. Asimismo, de la región pericentromérica del B se deberían haber eliminado las secuencias de la familia Hind III, que como hemos visto anteriormente se localizan en la región centromérica del cromosoma NOR. Así las cosas, parece más factible que la región pericentromérica del B proceda de otro cromosoma. De hecho, nuestros análisis ponen de manifiesto que la región pericentromérica de los cromosomas primero y segundo de *C. capillaris* están desprovistos de ADN altamente repetido como ocurre con el cromosoma B.

Si los Bs no se han originado a partir del cromosoma NOR cabría preguntarnos como han llegado los genes de ADNr a los cromosomas supernumerarios de esta especie. La transposición de genes de ADNr desde el cromosoma NOR a los cromosomas Bs podría ser un mecanismo capaz de explicar este hecho. Este mecanismo ha sido utilizado por otros autores para explicar las variaciones intra e interindividuales en el número de loci de ADNr en otras especies de plantas (Schubert y Wobus, 1985). Por otro lado, Green (1990) ha señalado la posibilidad de que en géneros de plantas como *Crepis* o *Allium* donde se ha detectado la presencia de cromosomas Bs con actividad nucleolar en

varias especies, los Bs pueden haberse originado en una de las especies y posteriormente se han transferido a las demás mediante hibridación. Para distinguir entre estas dos hipótesis, hemos llevado a cabo un análisis comparativo de los genes 18S y 25S en plantas con y sin cromosomas Bs. Si los cromosomas Bs de *C. capillaris* proceden de otras especies del género por hibridación, se esperaría que el ADNr de los Bs esté diferenciado respecto al que existe en el genoma normal de la planta, ya que el ADNr muestra variación interespecífica (Rogers y Bendich, 1987). De hecho, nuestros datos de hibridación en Southern-blot con ADNr en distintas especies del género *Crepis* demuestran la existencia de variaciones interespecíficas en las dianas de restricción, así como en la longitud de los genes ribosómicos (Fig. 18).

Después de digerir el ADN de plantas con y sin Bs con 16 enzimas de restricción diferentes e hibridarlo en Southern-blot con ADNr, no hemos detectado ninguna diferencia entre el ADNr del genoma estándar y del cromosoma B. Esta similitud en el ADNr de ambos tipos de cromosomas estaría de acuerdo con la hipótesis de que el ADNr de los Bs de *C. capillaris* procede del propio genoma de la especie. Si como hemos indicado anteriormente, todos los datos parecen indicar que el cromosoma B no se ha originado a partir del tercer par cromosómico o cromosoma NOR, la transposición o translocación de ADNr entre el genoma normal y los Bs podría ser un mecanismo capaz de explicar la presencia de ADNr en estos cromosomas.

Por último, cabe señalar que el análisis del ADN telomérico en plantas con y sin Bs ha puesto de manifiesto algunas diferencias entre los telómeros de los cromosomas A y B de *C. capillaris*. En primer lugar, los telómeros de los cromosomas Bs de *C. capillaris* están amplificadas con respecto a los que existen en los cromosomas estándar (Fig. 20). De hecho, la hibridación *in situ* con la sonda ADN telomérico de *Arabidopsis thaliana* muestra una gran señal de hibridación en los telómeros de los Bs pero no en la de los cromosomas

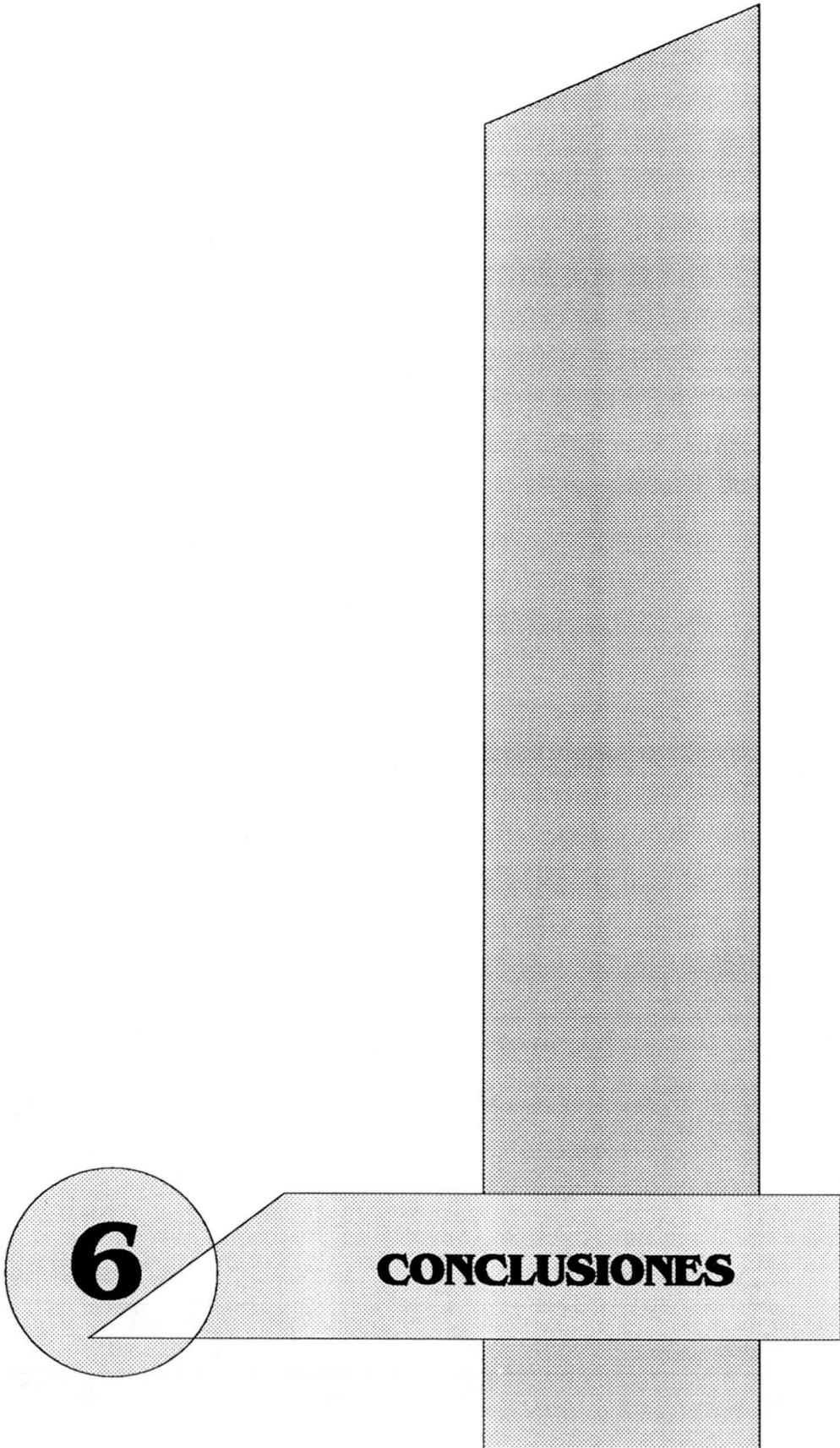
As. La ausencia de hibridación en los telómeros de los As no puede deberse a diferencias en la secuencia entre el ADN telomérico de *C. capillaris* y el de *Arabidopsis*, ya que en Southern-blot el ADN telomérico de *Arabidopsis* hibrida tanto con el ADN de plantas con Bs como con el de plantas sin Bs (Fig. 21). Además, las digestiones del ADN de plantas con y sin Bs con la exonucleasa Bal 31 demuestran que la hibridación que proporciona la sonda telomérica de *Arabidopsis* es debida únicamente a secuencia teloméricas (Fig. 21). Esta ausencia de hibridación en los telómeros de los As seguramente se debe a que la longitud del ADN telomérico en los cromosomas estándar es mucho menor que en los cromosomas Bs y, por tanto, no puede ser detectado mediante la técnica de hibridación *in situ* utilizada. Variaciones en la longitud del ADN telomérico entre distintos cromosomas se ha detectado también mediante hibridación *in situ* en centeno y cebada (Schwarzacher y Heslop-Harrison, 1991; Wang *et al.*, 1991).

El hecho de que ambos telómeros del B se encuentren amplificadas viene a confirmar todos los datos que habían indicado que el B de *C. capillaris* es un isocromosoma. La localización simétrica del ADNr y de la heterocromatina a ambos lados del centrómero (Maluszynska y Schweizer, 1989; Figs. 1 y 15), así como el apareamiento que sufren los brazos del B durante la meiosis (Jones *et al.*, 1989) demuestran también su naturaleza isocromosómica. Esto indica que durante su evolución, los cromosomas Bs de esta especie han podido pasar por una etapa como un fragmento telocéntrico que posteriormente mediante misdivisión ha dado lugar a un isocromosoma metacéntrico. Según estos datos, la ausencia de hibridación en uno de los telómeros de los Bs en algunos de los individuos estudiados (Fig. 20C-D) indicaría que la mayor parte del ADN telomérico se ha delecionado en uno de los brazos del B. El análisis del ADN telomérico mediante electroforesis de pulso ha puesto de manifiesto la existencia de un alto grado de polimorfismo para la longitud de los clusters de ADN telomérico tanto en animales como en plantas (Kipling y Cooke, 1990; Broun *et al.*, 1992). Todos los datos parecen indicar que los telómeros eucarióticos son

estructuras dinámicas cuya longitud se mantiene gracias a un balance entre los mecanismos que eliminan ADN telomérico tales como la replicación incompleta de los telómeros y aquellos que elongan el telómero (replicación *de novo* mediante la telomerasa o fenómenos de recombinación).

Además de esta variación en el tamaño de los telómeros, nuestros datos de hibridación en Southern-blot ponen de manifiesto la existencia de fragmentos de restricción específicos asociados con los cromosomas Bs (Fig. 21), lo que indicaría que la secuencia del ADN telomérico de los Bs muestra ciertas diferencias respecto de la que existe en los As. Podríamos pensar que estos fragmentos de restricción proceden de regiones no teloméricas del B. Sin embargo, la digestión con Bal 31 del ADN de plantas con Bs demuestra que dichos fragmentos surgen de la digestión de los extremos del cromosoma, ya que a medida que aumentamos la digestión con la exonucleasa estos fragmentos de restricción desaparecen (Fig. 21). Si tenemos en cuenta que los Bs se han originado posiblemente a partir de un fragmento o fragmentos de uno o varios de los cromosomas estándar como consecuencia de una o varias roturas cromosómica, es de esperar que los telómeros de los Bs se hayan sintetizado *de novo* tras su origen. En este sentido, cabe señalar que la adquisición de un nuevo telómero como consecuencia de reordenaciones cromosómicas puede también originar polimorfismos dentro del ADN telomérico. Así, en *Plasmodium falciparum*, la síntesis de ADN telomérico en varios sitios de rotura cromosómica estudiados es heterogénea, es decir la secuencia de las repeticiones teloméricas que se sintetizan *de novo* son diferentes en cada uno de los sitios (Scherf y Mattei, 1992). Por tanto, es posible que en la síntesis de ADN telomérico en los Bs se haya producido a partir de repeticiones teloméricas distintas de las que existen en los cromosomas estándar. Teniendo en cuenta estas diferencias entre el ADN telomérico de los cromosomas A y B de *C. capillaris*, estamos intentando clonar estos fragmentos de restricción específicos del B y comparar su secuencia con el ADN telomérico de los cromosomas As.

En resumen, nuestros resultados indican que el origen y evolución de los cromosomas Bs es un proceso bastante complejo. Todos los datos parecen indicar de momento que los cromosomas Bs proceden del genoma estándar. Sin embargo, en su origen pueden intervenir más de un cromosoma tal y como ocurre con los Bs de *C. capillaris* en los que el ADN ribosómico del B procede del cromosoma NOR, mientras que la región paracentromérica y el ADN telomérico seguramente tienen un origen cromosómico diferente. Además, durante su evolución no solo pueden ocurrir ciertos cambios a nivel del centrómero tales como misdivisión, sino también a nivel del telómero (amplificación y diferenciación), así como determinados fenómenos capaces de cambiar la organización de parte de la cromatina del B, de forma que regiones eucromáticas sin ADN altamente repetido puedan llegar a heterocromatinizarse de forma constitutiva. Las hipótesis que proponen una diferenciación e incluso una degeneración del ADN de los Bs no se han confirmado en el caso de *C. capillaris*. De hecho, nosotros hemos encontrado que el B de *C. capillaris* solamente se ha diferenciado parcialmente de los cromosomas Bs en algunas secuencias tales como las regiones ricas en CA o el ADN telomérico. Si, en general, el origen y evolución de todos los cromosomas Bs es tan complejo como el de *C. capillaris*, entonces es fácil explicar porqué no se ha determinado aún el origen de ninguno de estos cromosomas, incluso en aquellos casos en donde se ha llevado a cabo un análisis a nivel molecular del B, tal como ocurre en los casos del maíz (Peacock *et al.*, 1981), centeno (Sandery *et al.*, 1990), *Glosina* (Amos y Dover, 1981), *Brachycome dichromosomatica* (John *et al.*, 1991) o *Nasonia vitripennis* (Nur *et al.*, 1988; Eickbush *et al.*, 1992).



6

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

PRIMERA: Los resultados obtenidos mediante la técnica hibridación sustractiva F-PERT, así como los obtenidos mediante hibridación *in situ* con ADN genómico (GISH) demuestran que el ADN que forma parte de los cromosomas Bs de *C. capillaris* es muy similar al ADN de los cromosomas As. Solamente uno de los clones recombinantes obtenidos mediante F-PERT, el cual contiene una secuencia rica en CA que hibrida tanto con el ADN de plantas con Bs como con el de plantas sin Bs, fué capaz de poner de manifiesto ciertas diferencias entre las regiones ricas en CA de los cromosomas A y B de *C. capillaris*.

SEGUNDA: Se confirma la hipótesis enunciada por algunos autores de que los cromosomas B pueden tener una organización distinta a la de los cromosomas estándar. De hecho, en *C. capillaris*, ninguna de las tres familias de ADN satélite que hibridan con la heterocromatina constitutiva de los cromosomas As, ha mostrado homología con la heterocromatina de los Bs. Estos datos y los obtenidos mediante hibridación *in situ* con ADN genómico de plantas con y sin Bs indican que la región paracentromérica del cromosoma B de *C. capillaris*, aunque heterocromática, carece de ADN altamente repetido. Por tanto, es posible que la heterocromatinización sea un proceso capaz de cambiar rápidamente la conformación de parte de la cromatina de los cromosomas Bs impidiendo el apareamiento entre los cromosomas A y B, y suprimiendo la actividad génica en estos cromosomas.

TERCERA: Aunque se confirma que los cromosomas Bs de *C. capillaris* poseen cistrones de ADN ribosómico 18S + 25S, sin embargo, la ausencia en el cromosoma B de algunos marcadores tales como el ADN 5S y la familia de ADN repetido Hind III, que se localizan próximos al ADN_r en el cromosoma NOR, pone seriamente en duda la hipótesis de que

el cromosoma B de *C. capillaris* se haya originado únicamente a partir de la región cromosómica próxima al NOR del tercer par cromosómico.

CUARTA: La comparación del ADN ribosómico 18S + 25S de plantas sin cromosomas Bs y plantas con Bs mediante hibridación en Southern-blot no ha puesto de manifiesto ninguna diferencia entre el ADNr de los cromosomas A y B de *C. capillaris*. Puesto que hemos comprobado la existencia de variaciones entre el ADNr de las distintas especies del género *Crepis* analizadas, se puede concluir que el ADNr del cromosoma B de *C. capillaris* procede del propio genoma de la especie.

QUINTA: La longitud de los telómeros de los cromosomas Bs de *C. capillaris* es relativamente mucho mayor que la de los cromosomas As. El hecho de que los dos telómeros del B se encuentren amplificados confirma de nuevo que el cromosoma B de *C. capillaris* es un isocromosoma. Entre el ADN telomérico de los cromosomas A y B existe también ciertas diferencias en la secuencia, las cuales se han puesto de manifiesto como fragmentos de restricción específicos en el ADN telomérico de plantas con Bs. Teniendo en cuenta que el cromosoma B de *C. capillaris* ha debido originarse como consecuencia de una rotura cromosómica, se podría pensar que la síntesis *de novo* del ADN telomérico en los extremos del B se ha producido a partir de repeticiones teloméricas distintas a las que existen en los As.

SEXTA: La heterocromatina constitutiva de *C. capillaris* está mayoritariamente formada por tres familias de ADN altamente repetido o ADN satélite, cada uno de los cuales se organiza en unidades repetidas de pequeño tamaño. El análisis de la secuencia de uno de los monómeros de cada familia ha puesto de manifiesto la existencia de pequeñas regiones de homología entre las familias, lo que indicaría que estos satélites han podido originarse a partir de una única secuencia o haber evolucionado unos a partir de otros. Dos de estos ADNs satélites

(la familia Eco RI y la familia Dra I) son propios de la especie. En cambio, el satélite Hind III muestra homología con el genoma de algunas especies del género analizadas, lo que indicaría que éste último satélite es más antiguo que los dos anteriores.

SEPTIMA: Las unidades de las tres familias de ADN heterocromático aisladas de *C. capillaris* se organizan en tándem formando largos clusters de ADN homogéneo. No obstante, tanto los datos de hibridación en Southern-blot como los de hibridación *in situ* indican que la familia Hind III puede tener varias formas de organización genómica. En concreto, la mayor parte de las unidades de esta familia se organizarían en tándem formando grandes clusters en la heterocromatina paracentromérica del cromosoma NOR, pero también formando pequeños clusters de tamaño variable, los cuales se distribuyen de forma dispersa a lo largo del brazo largo de este par cromosómico.

NOVENA: Las tres familias de ADN satélite muestran una distribución particular en la heterocromatina de *C. capillaris*: La familia Eco RI se distribuye sobre las bandas C más próximas al centrómero, la familia Dra I se localiza en todas las bandas C del cariotipo excepto en las asociadas al NOR, y la familia Hind III está específicamente localizada en el cromosoma NOR, tanto en la banda C paracentromérica como a lo largo de todo el brazo largo de este par cromosómico. Teniendo en cuenta que las bandas C más equilocales respecto al centrómero están formadas por las mismas familias de ADN repetido, es posible pensar que la amplificación y distribución del ADN satélite está condicionada por una disposición espacial de los cromosomas en los núcleos mitóticos que mantenga próximas a las regiones equilocales.

DECIMA: Se demuestra por primera vez la asociación específica de una familia de ADN repetido con los cromosomas NORs. Este hecho puede estar relacionado con la disposición espacial de estos cromosomas en los núcleos interfásicos, ya que al menos en *C. capillaris* la hibridación *in situ* con la familia de ADN repetido Hind III demuestra que los dos cromosomas NORs homólogos muestran una disposición espacial muy cercana en aproximadamente un 50% de los núcleos interfásicos y profásicos.

UNDECIMA: La hibridación *in situ* simultánea con la familia de ADN repetido Eco RI y Dra I sobre los núcleos meióticos ha puesto de manifiesto que, mientras los clusters de la familia Eco RI tienden a asociarse en aproximadamente un 60% de las células en leptotenezygotene, los de la familia Dra I no se asocian durante ningún estadio de la primera profase meiótica. Teniendo en cuenta que la homogeneidad entre las unidades de la familia Eco RI es mayor que entre las de la familia DraI, es posible que la asociación de la heterocromatina durante la primera profase meiótica conlleve una mayor homogenización de las unidades de ADN repetido que forman parte de la misma.

DUODECIMA: El ADN ribosómico 18S + 25S de *C. capillaris* se localiza en la constricción secundaria o NOR del tercer par cromosómico, así como en el satélite heterocromático terminal asociado a la constricción secundaria, lo que demuestra que en *C. capillaris* la heterocromatina asociada al NOR está formada por ADNr y no por otro tipo de ADN repetido.

DECIMOTERCERA: El ADN ribosómico 18S + 25S de *C. capillaris* se organiza en unidades repetidas en tándem de 9 y/o 8.8 Kb. Mientras las unidades de 9 Kb aparecen en todos los individuos analizados, las de 8.8 Kb varían en número de unos individuos a otros. Este polimorfismo

es independiente del número de cromosomas Bs del individuo, lo que indica que ambas unidades de repetición coexisten dentro del único locus de ADNr del genoma estándar de la especie. La variación en el tamaño de la unidades de ADNr está causada por una variación en el tamaño del espaciador intergénico, el cual es probable que surja como consecuencia de variaciones en el número de subrepeticiones dentro de dicho espaciador.

DECIMOCUARTA. El ADN ribosómico 5S de *C. capillaris* se organiza en unidades repetidas en tándem de aproximadamente 350 pb, las cuales se localizan entre la constricción secundaria y el centrómero del tercer par cromosómico o cromosoma NOR. Aunque próximas en su localización cromosómica, la familia de ADN ribosómico 18S + 25S y ADN 5S se organizan en unidades completamente separadas.

7

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

- ABRAHAM, S.; AMES, I.H.; SMITH, H.H. 1968. Autoradiographic studies of DNA synthesis in the B chromosome of *Crepis capillaris*. *J. Hered.* 59:297-299.
- AMOS, A.; DOVER, G. 1981. The distribution of repetitive DNAs between regular and supernumerary chromosomes in species of *Glossina* (Tsetse): a two-step process in the origin of supernumeraries. *Chromosoma* 81:673-690.
- ANDERSON, D.M.; SCHELLER, R.H.; POSAKONY, J.W.; MCALLISTER, L.B.; TRABERT, S.G.; BEALL, C.; BRITTEN, R.J.; DAVIDSON, E.H. 1981. Repetitive sequences of the Sea Urchin genome. Distribution of members of specific repetitive families. *J Mol Biol* 145:5-28.
- APPELS, R.; DRISCOLL, C.; PEACOCK, W.J. 1978. Heterochromatin and highly repeated DNA sequences in rye (*Secale cereale*). *Chromosoma* 70:67-89.
- APPELS, R.; DVORAK, J. 1982. The wheat ribosomal DNA spacer region: Its structure and variation in populations and among species. *Theor. Appl. Genet.* 63:337-348.
- APPELS, R.; GERLACH, W.L.; DENNIS, E.S.; SWIFT, H.; PEACOCK, W.J. 1980. Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals. *Chromosoma* 78:293-311.
- APPELS, R.; MCINTYRE, C.L. 1985. Cereal genome organization as revealed by molecular probes. *Oxford Surveys of Plant Molec. and Cell Biol.* 2:235-252.
- APPELS, R.; MCINTYRE, C.L.; CLARKE, B.C.; MAY, C.E. 1986. Alien chromatin in wheat: ribosomal DNA spacer probes for detecting specific nucleolus organizer region loci introduced into wheat. *Can. J. Cytol.* 28:665-672.
- ARNASON, O.; PUDOM, I.F.; JONES, K.W. 1978. Conservation and chromosomal location of DNA satellites in balaenopteroid whales. *Chromosoma* 66:141-159.

- ARNHEIM, N. 1983. Concerted evolution of multigene families. En: Evolution of genes and proteins. R. Koehn y M. Nei (eds.) Sinauer, Sunderland. pp,38-61.
- ARNHEIM, N.; KRYSTAL, M.; SCHMICKEL, R.; WILSON, G.; RYDER, O.; ZIMMER, E. 1980. Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on nongomologous chromosomes in man and apes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7323-7327.
- AYONOADU, U.W.; REES, H. 1964. The effects of B chromosomes on the nuclear phenotype in root meristems of maize. *Caryologia* 17:365-383.
- BABCOCK, E.B. 1947. The genus *Crepis*. Univ. Calif. Publ. Bot. 21 y 22.
- BARCISZEWSKA, M.Z.; MASHKOVA, T.D.; KISSELEV, L.L.; BARCISZEWSKA, J. 1985. The primary structure of maize and tobacco 5S rRNA. *FEBS Lett.* 192:289-293.
- BARNES, S.R.; JAMES, A.A.; JAMIESON, G. 1985. The organisation, nucleotide sequence and chromosome distribution of a satellite DNA from *Allium cepa*. *Chromosoma* 92:185-192.
- BATISTONI, R.; NARDI, I.; NARDONE, M.; DEMARTIS, A. 1991. A centromeric satellite DNA in the European plethodontid salamanders (Amphibia, Urodela). *Genome* 34:1007-1012.
- BATISTONI, R.; VIGNALI, R.; NEGRONI, A.; CREMISI, F.; BARSACCHI-PILONE, G. 1986. A highly repetitive DNA family is dispersed in small clusters throughout the *Triturus* genome. *Cell Biol. Int. Rep.* 10:486.
- BAUWENS, S.; VAN OOSTVELDT, P.; ENGLER, G.; VAN MONTAGU, M. 1991. Distribution of the rDNA and three classes of highly repetitive DNA in the chromatin of interphase nuclei of *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma* 101:41-48.
- BEDBROOK, J.R.; O'DELL, M.; FLAVELL, R.B. 1980. Amplification of rearranged repeated sequences in cereal plants. *Nature* 288:133-137.
- BELOTOTSKY, D.A.; ANANIEV, E.V. 1990. Characterization of relic DNA from barley genome. *Theor. Appl. Genet.* 80:374-380.

- BENNETT, M.D.; SMITH, J.B. 1991. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Trans. R. Soc. London* 334:309-345.
- BLACKBURN, E.H. 1990. Telomeres and their synthesis. *Science* 249:489-490.
- BLACKBURN, E.H. 1991. Structure and function of telomeres. *Nature* 350:569-573.
- BLACKBURN, E.H.; GALL, J.G. 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J. Mol. Biol.* 120:33-53.
- BLACKBURN, E.H.; SZOSTAK, J.W. 1984. The molecular structure of centromeres and telomeres. *Ann. Rev. Biochem.* 53:163-194.
- BRAUM, M.; APPELS, R. 1991. The cytogenetic and molecular architecture of chromosome 1R - one of the most widely utilized sources of alien chromatin in wheat varieties. *Chromosoma* 101:1-10.
- BRITTEN, R.J.; KOHNE, D.E. 1968. Repeated sequences in DNA. *Science* 161:529-540.
- BRITTEN, R.J.; DAVIDSON, E.H. 1971. Repetitive and non repetitive DNA sequences and speculation on the origins of evolutionary novelty. *Quart. Rev. Biol.* 46:111-137.
- BROCKHOUSE, C.; BASS, J.A.B.; FERADAY, R.M.; STRAUSS, N.A. 1989. Supernumerary chromosome evolution in the *Simulium vernum* group (Diptera: Simuliidae). *Genome* 32:516-521.
- BROUN, P.; GANAL, M.W.; TANKSLEY, S.D. 1992. Telomeric arrays display high levels of heritable polymorphism among closely related plant varieties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:1354-1357.
- BROWN, W.R.A. 1992. Telomerase and chromosome healing. *Current Biology* 2:127-129.
- BRUTLAG, D.L. 1980. Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. *Annu. Rev. Genet.* 14:121-144.
- BUESCHER, P.J.; PHILLIPS, R.L.; BRAMBL, R. 1984. Ribosomal RNA contents of maize genotypes with different ribosomal RNA gene numbers. *Biochem Genet.* 22:923-930.

- CABRERO, J.; ALCHE, J.D.; CAMACHO, J.P.M. 1987. Effects of B chromosomes on the activity of nucleolar organizer regions in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*: activation of a latent nucleolar organizer region on a B chromosome fused to an autosome. *Genome* 29:116-121.
- CAMERON, D.R. 1934. The chromosomes and relationships of *Crepis syriaca* (Bornm.). *Univ. Calif. Publ. Agric. Sci.* 6:357-386.
- CARMONA, M.J.; DE DOMINICIS, R.I.; SALVI, G.; MAGGINI, F. 1984. Ribosomal RNA genes in biotypes of *Scilla peruviana* (*Liliaceae*). *Pl. Syst. Evol.* 146:1-11.
- CASNA, N.J.; NOVACK, D.F.; HSU, M.T.; FORD, J.P. 1986. Genomic analysis. II. Isolation of high molecular weight heteroduplex DNA following differential methylase protection and formamide-PERT hybridization. *Nucleic Acids Res.* 14:7285-7303.
- CHILTON, M.D.; McCARTHY, B.J. 1973. DNA from maize with and without B chromosomes: a comparative study. *Genetics* 74:605-614.
- CONDIT, R.; HUBBELL, S.P. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34:66-71.
- COOKE, H. 1976. Repeated sequence specific to human males. *Nature* 262:182-186.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol Biol Rep* 1:19-21.
- DELSENY, M.; McGRATH, J.M.; THIS, P.; CHEVRE, A.M.; QUIRON, C.F. 1990. Ribosomal RNA genes in diploid and amphidiploid *Brassica* and related species: organization, polymorphism, and evolution. *Genome* 33:733-744.
- DOOLITTLE, W.F. 1985. The evolutionary significance of middle repetitive DNA. En: *The Evolution of Genome Size*. T. Cavalier-Smith (ed). John Wiley and Sons Ltd. pp, 443-487.
- DOOLITTLE, W.F.; SAPIENZA, C. 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284:601-603.

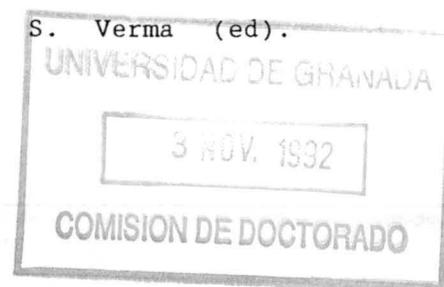
- DOVER, G.A. 1976. Observations on the repeated sequence DNA of "A" and "B" chromosomes of genotypes in the Triticinae with contrasting patterns of meiotic chromosome pairing. *Chromosomes Today* 5:131-145.
- DOVER, G.A. 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 284:111-117.
- DOVER, G.A. 1986. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *TIG* 2:159-165.
- DOVER, G.A.; HENDERSON, S.A. 1976. No detectable satellite DNA in supernumerary chromosomes of the grasshopper *Myrmeleotettix*. *Nature* 259:57-59.
- DVORAK, J.; ZHANG, H.B.; KOTA, R.S.; LASSNER, M. 1989. Organization and evolution of the 5S ribosomal RNA gene family in wheat and related species. *Genome* 32:1003-1016.
- DYSON, P.; SHERRATT, D. 1985. Molecular mechanisms of duplication, deletion and transposition. En: The evolution of genome size. T. Cavalier-Smith (ed.). John Wiley and Sons Ltd. pp, 353-396.
- EARNSHAW, W.C.; MIGEON, B. 1985. Three related centromere proteins are absent from the inactive centromere of a stable isodicentric chromosome. *Chromosoma* 92:290-296.
- EICKBUSH, D.G.; EICKBUSH T.H.; WERREN, J.H. Molecular characterization of repetitive DNA sequences from a B chromosome. 1992. *Chromosoma* 101:575-583.
- ELLIS, T.H.N.; DAVIES, D.R.; CASTLETON, J.A.; BEDFORD, I.D. 1984. The organization and genetics of rDNA length variants in peas. *Chromosoma* 91:74-81.
- ELLIS, T.H.N.; LEE, D.; THOMAS, C.M.; SIMPSON, W.G.; CLEARY, W.G.; NEWMAN, M.A.; BURCHAM, K.W.G. 1988. 5S rRNA genes in *Pisum*: Sequence, long range and chromosomal organization. *Mol. Gen. Genet.* 214:333-342.
- FERRER, E.; LACADENA, J.R. 1977. Homologous somatic association in radial metaphases of *Crepis* species. *Chromosoma* 64:25-36.

- FLAVELL, R.B. 1980. The molecular characteristics and organisation of plant chromosome DNA sequences. *A. Rev. Pl. Physiol.* **31**:569-596.
- FLAVELL, R.B. 1982a. Chromosomal DNA sequences and their organization. En: *Nucleic Acids and Proteins in Plants*. B. Parthier y D. Boulter (eds). Springer-Verlag. pp, 46-74.
- FLAVELL, R.B. 1982b. Sequence amplification, deletion, and rearrangement: major sources of variation during species divergence. En: *Genome Evolution*. G.A Dover y R.B. Flavell (eds.). Academic Press, New York. pp, 301-324.
- FLAVELL, R.B. 1985. Repeated sequences and genome change. En: *Genetic Flux in Plants*. B. Hohn y E.S. Dennis (eds.). Springer-Verlag. Vienna/New York. pp, 139-156.
- FLAVELL, R.B. 1986a. Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **312**:227-242.
- FLAVELL, R.B. 1986b. The structure and control of expression of ribosomal RNA genes. En: *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*. B. Mifflin (ed.). Oxford University Press, Oxford. pp, 251-174.
- FLAVELL, R.B.; O'DELL, M.; THOMPSON, W.F. 1988. Regulation of cytosine methylation in ribosomal DNA and nucleolus organizer expression in wheat. *J. Mol. Biol.* **204**:523-534.
- FUSSELL, C.P. 1984. Interphase chromosome order: a proposal. *Genetica* **62**:193-201.
- GALL, J.G.; ATHERTON, D.D. 1974. Satellite DNA sequences in *Drosophila virilis*. *J. Mol. Biol.* **85**:633-664.
- GANAL, M.; HEMLEBEN, V. 1988. Insertion and amplification of a DNA sequence in satellite DNA of *Cucumis sativus* L. (cucumber). *Theor. Appl. Genet.* **75**:357-361.
- GANAL, M.; RIEDE, I.; HEMLEBEN, V. 1986. Organization and sequence analysis of two related satellite DNAs in cucumber (*Cucumis sativus* L.) *J. Mol. Evol.* **23**:23-30.

- GANAL, M.W.; LAPITAN, N.L.V.; TANKSLEY, S.D. 1988. A molecular and cytogenetic survey of major repeated DNA sequences in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Mol. Gen. Genet.* 213:262-268.
- GANAL, M.W.; LAPITAN, N.L.V.; TANKSLEY, S.D. 1991. Macrostructure of the tomato telomeres. *Plant Cell* 3:87-94.
- GARRIDO RAMOS, M.A.; JAMILENA, M.; LOZANO, R.; RUIZ REJON, C.; RUIZ REJON, M. 1992. A cytogenetical and molecular analysis of the ribosomal cistrons of *Allium sphaerocephalon* L. (*Liliaceae*). *Heredity* 69:43-49.
- GERLACH, W.L.; APPELS, R.; DENNIS, E.S.; PEACOCK, W.J. 1978. Evolution and analysis of wheat genomes using highly repeated DNA sequences. En: Proceeding of the 5th International Wheat Genetics Symposium. S. Ramanujam (ed.). New Delhi. pp, 81-91.
- GERLACH, W.L.; BEDBROOK, J.R. 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res.* 7:1869-1885.
- GIVENS, J.F.; PHILLIPS, R.L. 1976. The nucleolus organizer region of maize (*Zea mays* L.): Ribosomal RNA gene distribution and nucleolar interactions. *Chromosoma* 57:103-117.
- GOLDSBROUGH, P.B.; ELLIS, T.H.N.; LOMONOSOFF, G.P. 1982. Sequence variation and methylation of the flax 5S-rRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 10:4501-4514.
- GOTTLÖB-McHUGH, S.G.; LEVESQUE, M.; MacKENZIE, K.; OLSON, M.; YAROSH, O.; JOHNSON, D.A. 1990. Organization of the 5S rRNA genes in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill and conservation of the 5S rDNA repeat structure in higher plants. *Genome* 33:486-494.
- GREEN, D.M. 1990. Muller's ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. *Genome* 33:818-824.
- GREILHUBER, J.; SPETA, F. 1976. C-banded karyotypes in the *Scilla hohenackeri* group *S. persica* and *Puschkinia* (*Liliaceae*). *Plant Syst. Evol.* 126:149-188.

- GRELLET, F.; DELCASSO-TREMOUSAYGUE, D.; DELSENY, M. 1989. Isolation and characterization of an unusual repeated sequence from the ribosomal intergenic spacer of the crucifer *Sisymbrium irio*. *Plant Mol. Biol.* 12:695-706.
- GRELLET, F.; DELCASSO, D.; PANABIERES, F.; DELSENY, M. 1986. Organization and evolution of a higher plant alphoid-like satellite DNA sequence. *J. Mol. Biol.* 187:495-507.
- GUILLEN, A.; RUIZ REJON, M. 1984. The B chromosome system of *Allium sphaerocephalon* L. (Liliaceae): types, effects and origin. *Caryologia* 37:259-267.
- GUPTA, M.; SHEPHERD, N.S.; BERTRAM, I.; SAEDLER, H. 1984. Repetitive sequences and their organization on genomic clones of *Zea mays*. *EMBO J.* 3:133-139.
- GUPTA, V.; JAGANNATHAN, V.; LAKSHMIKUMARAN, M.S. 1990. A novel AT-rich tandem repeat of *Brassica nigra*. *Plant Sci.* 68:223-229.
- GYLLEENSTEN, U.B.; JAKOBSSON, S.; TEMRIN, H.; WILSON, A.C. 1989. Nucleotide sequence and genomic organization of bird minisatellites. *Nucleic Acids Res.* 17:2203-2214.
- HALLDEN, C.; BRYNGELSSON, T.; SÄLL, T.; GUSTAFSSON, M. 1987. Distribution and evolution of a tandemly repeated DNA sequence in the family *Brassicaceae*. *J. Mol. Biol.* 25:318-323.
- HAMADA, H.; PETRINO, M.G.; KAKUNAGA, T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6465-6469.
- HARWEY, A.W.; HEWITT, G.M. 1979. B-chromosomes slow development in a grasshopper. *Heredity* 42:397-401.
- HEITZ, E. 1935. Die Herkunft der chromozentren. *Planta* 18:571-635.
- HEMLEBEN, V.; GANAL, M.; GERSTNER, K.; SCHIEBEL, K.; TORRES, R.A. 1986. Organization and length heterogeneity of plant ribosomal RNA genes. En: *The Architecture of Eukaryotic Genes*. G. Kahl (ed.). V.C.H. Verlagsgesellschaft, Weinheim. pp, 372-383.

- HEWITT, G.M.; EAST, T.M.; SHAW, M.W. 1987. Sperm dysfunction produced by B-chromosomes in the grasshopper *Myrmeleotettix maculatus*. *Heredity* 58:59-68.
- HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; PORTER, C.A.; BAKER, R.J. 1991. Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science* 251:308-310.
- HÖRZ, W.; ZACHAU, H.G. 1977. Characterization of distinct segments in mouse satellite DNA by restriction nucleases. *Eur. J. Biochem.* 73:383-392.
- HUIJSER, P.; HENNING, W.; DIJKHOF, R. 1987. Poly(dC-dA/dG-dT) repeats in the *Drosophila* genome. *Chromosoma* 95:209-215.
- HUTCHINSON, J.; NARAYAN, R.K.J.; REES, H. 1980. Constraints upon the composition of supplementary DNA. *Chromosoma* 78:137-145.
- JACKSON, R.C. 1960. Supernumerary chromosomes in *Haplopappus gracilis*. *Evolution* 14:135.
- JAGADEESWARAN, P.; FORGET, B.G.; WEISMANN, S.M. 1981. Short interspersed repetitive elements in eukaryotes: transposable DNA elements generated by reverse transcription of RNA polymerase III transcripts? *Cell* 24:141-142.
- JAMILENA, M.; RUIZ REJON, C.; RUIZ REJON, M. 1990. Variation in the heterochromatic and nucleolar organizing regions of *Allium subvillosum* L. (Liliaceae). *Genome* 33:779-784.
- JANTSCH, M.; HAMILTON, B.; MAYR, B.; SCHWEIZER, D. 1990. Meiotic chromosome behaviour reflects levels of sequence divergence in *Sus scrofa domestica* satellite DNA. *Chromosoma* 99:330-335.
- JEFFREYS, A.J. 1987. Highly variable minisatellites and DNA fingerprints. *Biochem. Soc. Trans.* 15:309-317.
- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. 1985. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 314:67-73.
- JOACHIMIAK, A. 1986. B-chromosome condensation in *Phenem* pollen grains. *Genetica* 68:169-174.
- JOHN, B. 1988. The biology of heterochromatin. En: Heterochromatin. Molecular and structural aspects. R. S. Verma (ed). Cambridge University Press. pp, 1-147.



- JOHN, B.; APPELS, R.; CONTRERAS, N. 1986. Population cytogenetics of *Atractomorpha similis*. II. Molecular characterisation of the distal C-band polymorphisms. *Chromosoma* 94:45-58.
- JOHN, U.P.; LEACH, C.R.; TIMMIS, J.N. 1991. A sequence specific to B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. *Genome* 34:739-744.
- JOHN, B.; MIKLOS, G.L.G. 1979. Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. *Int Rev Cytol* 58:1-14
- JONES, G.H.; WHITEHORN, J.; ALBINI, S. 1989. Ultrastructure of meiotic pairing in B-chromosomes of *Crepis capillaris*. I. 1B and 2B PMCs. *Genome* 32:611-621.
- JONES, J.D.G.; FLAVELL, R.B. 1982. The structure, amount and chromosome localisation of defined repeated DNA sequences in species of the genus *Secale*. *Chromosoma* 86:613-641.
- JONES, R.N. 1975. B-chromosome systems in flowering plants and animal species. *Int. Rev. Cytol.* 40:1-100.
- JONES, R.N. 1985. Are B chromosomes "selfish"? En: The evolution of genome size. T. Cavalier-Smith (ed.). John Wiley and Sons Ltd. pp, 397-425.
- JONES, R.N.; BROWN, L.M. 1976. Chromosome evolution and DNA variation in *Crepis*. *Heredity* 36:91-104.
- JONES, R.N.; REES, H. 1968. The influence of B-chromosome upon the nuclear phenotype in rye. *Chromosoma* 24:158-176.
- JONES, R.N.; REES, H. 1982. B chromosomes. Academic Press, London.
- JORGENSEN, A.L.; BOSTOCK, C.J.; BAK, A.L. 1987. Homologous subfamilies of human alphoid repetitive DNA on different nucleolus organizing chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1075-1079.
- KATO, A.; YAKURA, K.; TANIFUJI, S. 1984. Sequence analysis of *Vicia faba* repeated DNA, the FokI repeat element. *Nucleic Acids Res.* 16:6415-6426.
- KELLY, R.J.; JOHNSON, R.D.; SIEGEL, A. 1990. Heterogeneity and organization of the ribosomal RNA genes of *Cucurbita maxima*. *Plant Mol. Biol.* 14:927-933.

- KIPLING, D.; COOKE, H.J. 1990. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* 347:400-402.
- KIT, S. 1961. Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues. *J. Mol. Biol.* 3:711-716.
- KLEIN, A.S.; ECKHARDT, R.A. 1976. The DNA of the A and B chromosomes of the mealy bug, *Pseudococcus obscurus*. *Chromosoma* 57:333-340.
- KOCHKO, A.D.; KIEFER, M.C.; CORDESSE, F.; REDDY, A.S.; DELSENY, M. 1991. Distribution and organization of a tandemly repeated 352-bp sequence in the oryzae family. *Theor. Appl. Genet.* 82:57-64.
- KOHNE, D.E.; LEVISON, S.A.; BYERS, M.J. 1977. Room temperature method for increasing the rate of DNA reassociation by many thousandfold: the phenol emulsion reassociation technique. *Biochemistry* 16:5329-5341.
- KOLCHINSKY, A.; KANAZIN, V.; YAKOWLEVA, E.; GAZUMYAN, A.; KOLE, C.; ANANIEV, E. 1990. 5S-RNA genes of barley are located on the second chromosome. *Theor. Appl. Genet.* 80:333-336.
- KRYSTAL, M.; D'EUSTACHIO, P.; RUDDLE, F.H.; ARNHEIM, N. 1981. Human nucleolus organizers on nonhomologous chromosomes can share the same ribosomal gene variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5744-5748.
- KURNIT, D.M.; ROY, S.; STEWART, G.D.; SCHWEDOCK, J.; NEVE, R.L.; BRUNS, G.A.P.; VAN KEUREN, M.L.; PATTERSON, D. 1986. The 724 family of DNA sequences is interspersed about the pericentromeric regions of human acrocentric chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 43:109-116.
- LABHART, P.; REEDER, R.H. 1986. Characterization of three sites of RNA 3' end formation in the *Xenopus* ribosomal spacer. *Cell* 45:431-433.
- LAGUDAH, E.S.; APPELS, R.; McNEIL, D. 1991. The molecular-genetic analysis of *Triticum tauschii*, the D-genome donor of hexaploid wheat. *Genome* 34:375-386.

- LAM, B.S.; CARROLL, D. 1983. Tandemly repeated DNA sequences from *Xenopus laevis*. II. Dispersed clusters of a 388 base pair repeating unit. *J Mol Biol* 165:587-597.
- LAPITAN, N.L.V. 1992. Organization and evolution of higher plant nuclear genomes. *Genome* 35:171-181.
- LAPITAN, N.L.V.; GANAL, M.W.; TANKSLEY, S.D. 1991. Organization of the 5S ribosomal RNA genes in the genome of tomato. *Genome* 34:509-514.
- LEARN, G.H.; SCHAAL, B.A. 1987. Population subdivision for ribosomal DNA repeat variants in *Clematis fremontii*. *Evolution* 41:433-438.
- LECLERC, R.F.; SIEGEL, A. 1987. Characterization of repetitive elements in several *Curcubita* species. *Plant Mol. Biol.* 8:497-507.
- LEITCH, I.J.; LEITCH, A.R.; HESLOP-HARRISON, J.S. 1991. Physical mapping of plant DNA sequences by simultaneous in situ hybridization of two differently labelled fluorescent probes. *Genome* 34:329-333.
- LEUTWILER, L.S.; HOUGH-EVANS, B.R.; MEYEROWITZ, E.M. 1984. The DNA of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 194:15-23.
- LIMA-DE-FARIA, A.; ESSEN-MÖLLER, J.; MÜNTZING, A.; GRANSTRÖM, H.; OLSSON, E.; ISAKSSON, M. 1983. Comparison of DNA cleavage in rye with and without B chromosomes. *Hereditas* 99:203-208.
- LOHE, A.; ROBERTS, P. 1988. Evolution of satellite DNA sequences in *Drosophila*. En: Heterochromatin. Molecular and structural aspects. R.S. Verma (ed.). Cambridge University Press. pp,148-186.
- LOIDL, J. 1982a. B-chromosomes in *Allium flavum* (Liliaceae) and some related species. *Plant Syst. Evol.* 139:197-207.
- LONG, E.O.; DAWID, I.D. 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Int. Rev. Biochem.* 49:727-764.
- LÖNN, M.; TEGELSTRÖM, H.; PRENTICE, H.C. 1992. The synthetic (TG)_n polydinucleotide: a probe for gene flow and paternity studies in wild plant populations? *Nucleic Acids Res.* 20:1153.

- MACGREGOR, H.C.; HORNER, H.; SIMS, S.H. 1983. Newt chromosomes and some problems in evolutionary cytogenetics. En: Kew Chromosome Conference II. P.E. Branham y M.D. Bennett (eds). George Allen and Unwin. pp, 283-294.
- MACGREGOR, H.C.; SESSIONS, S.K. 1986a. Models for evolution in large genomes and karyotypes of Urodeles. *Verh Dtsch Zool Ges* 79:137-148.
- MACGREGOR, H.C.; SESSIONS, S.K. 1986b. The biological significance of variation in satellite DNA and heterochromatin in newts of the genus *Triturus*: An evolutionary perspective. *Philos Trans R Soc London* 312:243-259
- MAGGINI, F.; CARMONA, M.J. 1981. Sequence heterogeneity of the ribosomal DNA in *Allium cepa* (Liliaceae). *Protoplasma* 108:163-171.
- MAIZELS, N. 1976. *Dictyostelium* 17S, 25S y 5S rDNAs lie within a 38000 base pair repeated unit. *Cell* 9:431-438.
- MALUSZYNSKA, J. 1990. B chromosomes of *Crepis capillaris* (L.) Waller. *In vivo* and *in vitro*. B. Todos-Burny (ed.). Uniwersytet Slaski. Katowice.
- MALUSZYNSKA, J.; SCHWEIZER, D. 1989. Ribosomal RNA genes in B chromosomes of *Crepis capillaris* detected by non-radioactive *in situ* hybridization. *Heredity* 62:59-65.
- MANUELIDIS, L. 1978. Chromosomal locations of complex and simple repeated human DNAs. *Chromosoma* 66:23-32.
- MANUELIDIS, L. 1982. Repeated DNA sequences and nuclear structure. En: Genome Evolution. G.A. Dover y R.B. Flavell (eds.). Academic Press, New York. pp, 263-285.
- MARTIENSSEN, R.A.; BAULCOMBE, D.C. 1989. An unusual wheat insertion sequence WIS1 lies upstream of an alpha-amylase gene in hexaploid wheat, and carries a "minisatellite" array. *Mol. Gen. Genet.* 217:401-410.
- MARTINEZ-ZAPATER, J.; ESTELLE, M.; SOMMERVILLE, C. 1986. A highly repeated DNA sequence in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 204:417-423.

- MASCIA, P.N.; RUBENSTEIN, I.; PHILLIPS, R.L.; WANG, A.S.; XIANG, L.Z. 1981. Localization of the 5S rRNA genes and evidence for diversity in the 5S rDNA region of maize. *Gene* 15:7-20.
- McCLINTOCK, B. 1941. The stability of broken ends of chromosome in *Zea mays*. *Genetics* 26:234-289.
- McCLINTOCK, B. 1942. The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 28:458-463.
- McINTYRE, C.L.; REDDY, P.; APPELS, R. 1988. The 5S DNA loci in the Triticeae. Proceeding of the 7th International Wheat Genetics Symposium, Cambridge, Engrand. T.E. Miller y R.M.D. Koebner (eds.). pp, 769-773.
- McMULLEN, M.D.; HUNTER, B.; PHILIPS, R.L.; RUBENSTEIN, I. 1986. The structure of the maize ribosomal DNA spacer region. *Nucleic Acids Res.* 14:4953-4968.
- MEYNE, J.; RATCLIFF, R.L.; MOYZIS, R.K. 1989. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7049-7053.
- MILLER, D.A.; DEV, V.G.; TANTRAHAHI, R.; MILLER, O.J. 1976. Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. *Exp. Cell Res.* 101:235-243.
- MOOS, T. 1983. A transcriptional function for the repetitive ribosomal spacer in *Xenopus laevis*. *Nature* 302:223-228.
- MOYZIS, R.K.; BUCKINGHAM, J.M.; CRAM, L.S.; DANI, M; DEAVEN, L.L.; JONES, M.D.; MEYNE, J; RATLIFF, R.L.; WU, J.R. 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6622-6626.
- MUKAI, Y.; ENDO, T.R.; GILL, B.S. 1990. Physical mapping of the 5S rRNA multigene family in common wheat. *J. Hered.* 81:290-295.
- MÜLLER, H. J. 1938. The remaking of chromosomes. *Collect. Net.* 13:183-185.
- MULLER, H. J. 1964. The relation of recombination to mutational advance. *Mut. Res.* 1:2-9.

- MURRAY, A. 1990. All's well that ends well. *Nature* 346:797-798.
- NANNINGA, N.; OUD, J.L.; HOUTSMULLER, A.B.; MANS, A.; MONTIJN, B. 1992. Spatial arrangement of genes and chromosomes in plants comments on cell geneology and tissue specificity. *Cell Biology International Reports* 16:761-770.
- NEEDLEMAN, S.B.; WUNSCH, C.D. 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 48:443-453.
- NUR, U.; WERREN, J.H.; EICKBUSH, D.G.; BURKE, W.D.; EICKBUSH, T.H. 1988. A "selfish" B chromosome that enhances its transmission by eliminating the paternal genome. *Science* 240:512-514.
- OLIVER, J.L.; POSSE, F.; MARTINEZ ZAPATER, J.M.; ENRIQUEZ, A.M.; RUIZ REJON, M. 1982. B-chromosomes and E-1 isozyme activity in mosaic bulbs of *Scilla autumnalis* (Liliaceae). *Chromosoma* 85:399-403.
- ORGEL, L.E.; CRICK, F.H.C. 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284:604-607.
- OUD, J.L.; MANS, A.; BRACKENHOFF, G.L.; VAN DER VOORT, H.; VAN SPRONSEN, E.A.; NANNINGA, N. 1989. Three-dimensional chromosome arrangement of *Crepis capillaris* in mitotic prophase and anaphase as studied by confocal scanning laser microscopy. *J. Cell Sci* 92:329-339.
- PARDUE, M.L.; GALL, J.G. 1970. Chromosomal location of mouse satellite DNA. *Science* 168:1356-1358.
- PARKER, J.S.; AINSWORTH, C.C.; TAYLOR, S. 1981. The B-chromosome system of *Hypochoeris maculata*. II. B-effects on meiotic A-chromosome behaviour. *Chromosoma* 67:123-143.
- PARKER, J.S.; JONES, G.H.; EDGAR, L.; WHITEHOUSE, C. 1989. The population cytogenetics of *Crepis capillaris*. II. The stability and inheritance of B-chromosomes. *Heredity* 63:19-27.
- 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.

- PEARSON, W.R.; LIPMAN, D.J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448.
- PEETERS, J.P.; GRIFFITHS, A.J.F.; WILKES, G. 1985. In vivo karyotypic modifications following spontaneous cell fusion in maize (*Zea mays* L.). *Can. J. Genet. Cytol.* 27:580-585.
- RABL, C. 1885. Über Zellteilung. *Morphologisches Jahrbuch* 10:214-230.
- RAWLINS, D.J.; SHAW, P.J. 1988. Three-dimensional organization of chromosomes of *Crepis capillaris* by optical tomography. *J Cell Sci* 91:401-414.
- REDDY, P.; APPELS, R. 1989. A second locus for the 5S multigene family in *Secale* L.: sequence divergence in two lineages of the family. *Genome* 32:456-467.
- REEDER, R.H. 1984. Enhancers and ribosomal gene spacers. *Cell* 38:349-351.
- RICHARDS, E.J.; GOODMAN, H.M.; AUSUBEL, F.M. 1991. The centromere region of *Arabidopsis thaliana* chromosome 1 contains telomere-similar sequences. *Nucleic Acids Res.* 19:3351-3357.
- RICHARDS, E.J.; AUSUBEL, F.M. 1988. Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 53:127-136.
- RIMPAU, J.; FLAVELL, R.B. 1976. The repeated sequence DNA of B chromosomes of rye. *Chromosomes Today* 5:147-157.
- ROCHFORD, T.R.; OSTERMAN, J.C.; GARDNER, C.O. 1990. Variation in the ribosomal DNA intergenic spacer of a maize population mass-selected for high grain yield. *Theor. Appl. Genet.* 79:793-800.
- ROGERS, J. 1983. CACA sequences - the ends and the means? *Nature* 305:101-102.
- ROGERS, S.O.; BENDICH, A.J. 1987. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Mol. Biol.* 9:509-520.
- ROGERS, S.O.; BENDICH, A.J. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. En: *Plant Molecular Biology Manual* A6. S.B. Gelvin, R.A. Schilperoort, D.P.S. Verma (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Belgium. pp, 1-10.

- ROGERS, S.O.; HONDA, S.; BENDICH, A.J. 1986. Variation in the ribosomal RNA genes among individuals of *Vicia faba*. *Plant Mol. Biol.* 6:339-345.
- RUBIN, G.M.; SULTON, J.E. 1973. Physical linkage of the 5S cistrons to the 18S and 28S ribosomal RNA cistrons in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 79:521-530.
- RUIZ REJON, M.; POSSE, F.; OLIVER, J.L. 1980. The B chromosome system of *Scilla autumnalis* (Liliaceae). Effects at the isozyme level. *Chromosoma* 79:341-348.
- RUTISHAUSER, A. 1960. Fragmentchromosomen und Blütenentwicklung bei *Crepis capillaris*. *Beih. Z. Schweiz. Bot. Ges.* 80:195-226.
- RUTISHAUSER, A.; RÖTHLISBERGER, E. 1966. Boosting mechanisms of B chromosomes in *Crepis capillaris*. *Chromosomes Today* 1:28-30.
- SACRISTAN, M.D.; DOBRIGKEIT, I. 1973. Variable content of a (GC) rich satellite DNA in tumorous and normal cultures of *Crepis capillaris*. *Zeitschrift für Naturforschung* 28:564-567.
- SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:8014-8018.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SANDERY, M.J.; FORSTER, J.W.; BLUNDEN, R.; JONES, R.N. 1990. Identification of a family of repeated sequences on the rye B chromosome. *Genome* 33:908-913.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA* 74:5463-5467.
- SAPRE, A.B.; DESHPANDE, D.S. 1987. Origin of B chromosomes in *Coix L.* through spontaneous interspecific hybridization. *J. Hered.* 78:191-196.

- SCHERF, A.; MATTEI, D. 1992. Cloning and characterization of chromosome breakpoints of *Plasmodium falciparum*: breakage and new telomere formation occurs frequently and randomly in subtelomeric genes. *Nucleic Acids Res.* 20:1491-1496.
- SCHMIDT, T.; JUNG, C.; METZLAFF, M. 1991. Distribution and evolution of two satellite DNAs in the genus *Beta*. *Theor. Appl. Genet.* 82:793-799.
- SCHMIDT, T.; METZLAFF, M. 1991. Cloning and characterization of a *Beta vulgaris* satellite DNA family. *Gene* 101:247-250.
- SCHUBERT, I.; WOBUS, U. 1985. *In situ* hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* 92:143-148.
- SCHWARZACHER, T.; AMBROS, P.; SCHWEIZER, D. 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Syst Evol* 134:293-297.
- SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J.S. 1991. *In situ* hybridization to plant telomeres using synthetic oligomers. *Genome* 34:317-323.
- SCHWARZACHER, T.; LEITCH, A.R.; BENNETT, M.D.; HESLOP-HARRISON, J.S. 1989. *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Annals of Botany* 64:315-324.
- SCHWARZACHER, T.; MAYR, B.; SCHWEIZER, D. 1984. Heterochromatin and NOR behaviour at male pachytene of *Sus scrofa domestica*. *Chromosoma* 91:12-19.
- SCHWEIZER, D. 1980. Fluorescent chromosome banding in plants: applications, mechanisms, and implications for chromosome structure. En: *The Plant Genome. Proceedings of the fourth John Innes Symposium.* D.R. Davies y D.A. Hopwood (eds.). The John Innes Charity. pp, 61-72.
- SCHWEIZER, D.; LOIDL, J. 1987. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chromosomes Today* 9:61-74.

- SHEPHERD, N.S.; SCHWARZ-SOMMER, Z.; BLUMBERG VEL SPALVE, J.; GUPTA, M.; WIENAND, U.; SAEDLER, H. 1984. Similarity of the *CinI* repetitive family of *Zea mays* to eukaryotic transposable elements. *Nature* 307:185-187.
- SHIPPEN-LENTZ, D.; BLACKBURN, E.H. 1990. Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science* 247:546-552.
- SIBSON, D.R.; HUGHES, S.G.; BRYANT, J.A.; FITCHETT, P.N. 1991. Sequence organization of simple, highly repetitive DNA elements in *Brassica* species. *J. Exp. Botany* 42:243-249.
- SIMPSON, P.R.; NEWMAN, M.A.; ROY DAVIES, D. 1988. Detection of legumin gene DNA sequences in pea by in situ hybridization. *Chromosoma* 96:454-458.
- SIMS, S.H.; MACGREGOR, H.C.; PELLAT, P.S.; HORNER, H.A. 1984. Chromosome 1 in crested and marbled newts (*Triturus*). An extraordinary case of heteromorphism and independent chromosome evolution. *Chromosoma* 89:169-185.
- SINGER, M.F. 1982. Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int. Rev. Cytol.* 76:67-112.
- SINGER, M.; BERG, P. 1991. *Genes and Genomes*. University Science Books, California.
- SMITH, G.P. 1976. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossovers. *Science* 191:528-535.
- SMYTH, D.R. 1991. Dispersed repeats in plant genomes. *Chromosoma* 100:355-359.
- SMYTH, D.R.; KALITSIS, P.; JOSEPH, J.L.; SENTRY, J.W. 1989. Plant retrotransposon from *Lilium henryi* is related to Ty3 of yeast and gypsy group of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5015-5019.
- SOARES, M.B.; SCHON, E.; EFSTRAFIADIS, A. 1985. Rat LINE 1: the origin and evolution of a family of long interspersed middle repetitive elements. *J. Mol. Evol.* 22:117-133.
- SOLANO, R.; HUEROS, G.; FOMINAYA, A.; FERRER, E. 1992. Organization of repeated sequences in species of the genus *Avena*. *Theor. Appl. Genet.* 83:602-607.

- SUEOKA, N. 1961. Variation and heterogeneity of base composition of deoxyribonucleic acids: a compilation of old and new data. *J. Mol. Biol.* 3:31-40.
- SUJA, J.A.; GOSALVEZ, J.; LOPEZ-FERNANDEZ, C.; RUFAS, J.S. 1986. A cytogenetic analysis in *Psophus stridulus* (L.) (Orthoptera: Acrididae): B-chromosomes and abnormal spermatid nuclei. *Genetica* 70:217-224.
- SUMNER, A.T. 1990. Chromosome banding. Unwin Hyman, London.
- SUZUKI, H.; KURIHARA, Y.; KANEHISA, T.; MORIWAKI, K. 1990. Variation in the distribution of silver-staining nucleolar organizer regions on the chromosomes of the wild mouse, *Mus musculus*. *Mol. Biol. Evol.* 7:271-282.
- TAUTZ, D. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 12:4127-4138.
- TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17:6463-6471.
- THEO, S.B.; REES, H. 1977. B chromosomes in White Spruce. *Proc. Roy. Soc. B.* 198:325-344.
- TIMMIS, J.N.; INGLE, J.; SINCLAIR, J.; JONES, R.N. 1975. The genomic quality of rye B chromosomes. *J. Exp. Bot.* 26:367-378.
- TREMOUSAYGUE, D.; GRELLET, R.; DELSENY, M.; DELOURME, R.; RENARD, M. 1988. The large spacer of a nuclear ribosomal RNA gene from radish: organization and use as a probe in rapeseed breeding. *Theor. Appl. Genet.* 75:298-304.
- TUCCI, G.F.; MAGGINI, F. 1986. Ribosomal RNA genes in species of the *Cynareae* tribe (*Compositae*).I. *Protoplasma* 132:76-84.
- UNFRIED, K.; SCHIEBEL, K.; HEMLEBEN, V. 1991. Subrepeats of rDNA intergenic spacer present as prominent independent satellite DNA in *Vigna radiata* but not in *Vigna angularis*. *Gene* 99:63-68.

- VERSHININ, A.V.; SALINA, E.A.; SOLOVYOV, V.V.; TIMOFEYeva L.L. 1990. Genomic organization, evolution, and structural peculiarities of highly repetitive DNA of *Hordeum vulgare*. *Genome* 33:441-449.
- VIGNALI, R.; RIJLI, F.M.; BATISTONI, R.; FRATTA, D.; CREMISI, F.; BARSACCHI, G. 1991. Two dispersed highly repeated DNA families of *Triturus meridionalis* (Amphibia, Urodela) are widely conserved among Salamandridae. *Chromosoma* 100:87-96.
- VIOTTI, A.; PRIVITERA, E.; SALA, E.; POGNA, N. 1985. Distribution and clustering of two highly repeated sequences in the A and B chromosomes of maize. *Theor. Appl. Genet.* 70:234-239.
- WANG, S.; LAPITAN, N.L.; TSUCHIYA, T. 1991. Characterization of telomeres in *Hordeum vulgare* chromosomes by *in situ* hybridization. I. Normal diploid barley. *Jpn. J. Genet.* 66:313-316.
- WATSON, J.C.; KAUFMAN, L.S.; THOMPSON, W.F. 1987. Developmental regulation of cytosine methylation in the nuclear ribosomal RNA genes of *Pisum sativum*. *J. Mol. Biol.* 193:15-26
- WAYE, J.S.; WILLARD, H.F. 1989. Human beta satellite DNA: genomic organization and sequence definition of a class of highly repetitive tandem DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6250-6254.
- WEISING, K.; KAEMMER, D.; WEIGAND, F.; EPPLEN, J.T.; KAHL, G. 1992. Oligonucleotide fingerprinting reveals various probe-dependent levels of informativeness in chickpea (*Cicer arietinum*). *Genome* 35:436-442.
- WHITEHOUSE, C.; EDGAR, L.H.; JONES, G.H.; PARKER, J.S. 1981. The population cytogenetics of *Crepis capillaris*. I. Chiasma variation. *Heredity* 47:95-103.
- WILLARD, H.F.; WAYE, J.S. 1987a. Chromosome-specific subsets of human alpha satellite DNA: analysis of sequence divergence within and between chromosomal subsets and evidence for an ancestral pentameric repeat. *J. Mol. Evol.* 25:207-214.

- WILLARD, H.F.; WAYE, J.S. 1987b. Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. *TIG* 3:192-198.
- WILLIAMS, S.M.; STROBECK, C. 1985. Sister chromatid exchange and the evolution of rDNA spacer length. *J. Theor. Biol.* 116:625-636.
- YAKURA, K.; KATO, A.; TANIFUJI, S. 1984. Length heterogeneity in the large spacer of *Vicia faba* rDNA is due to the differing number of 325 bp repetitive sequence elements. *Mol. Gen. Genet.* 193:400-405.
- ZAKIAN, V.A. 1989. Structure and function of telomeres. *Annu. Rev. Genet.* 23:579-604.
- ZHIMULEV, I.F.; BELYAEVA, E.S.; FOMINA, O.V.; PROTOPOPOV, M.O.; BOLSHAKOV, V.N. 1986. Cytogenetic and molecular aspects of position effect variegation in *Drosophila melanogaster*. I. Morphology and genetic activity of the 2AB region in chromosome rearrangement T(1;2)dor^{var7}. *Chromosoma* 94:492-504.