

DIMENSIÓN CROMOSÓMICA

Palabras clave: Cariotipo, telómeros, poliploidía.
Key words: Karyotype, telomeres, polyploidy.

Desde la segunda década del siglo pasado, Argentina ha sido el epicentro del inicio y desarrollo de la citogenética en América latina. La citogenética es una disciplina que se caracteriza por su capacidad de constante rejuvenecimiento y resurgimiento, aún después de etapas de franca declinación de su manejo y aplicación. Los rasgos cromosómicos son cualidades determinísticas de gran valor predictivo y su estudio aunque requiere de cierta práctica artesanal, resulta una herramienta fundamental para acompañar tecnologías de vanguardia, como una herramienta poderosa, versátil y fundamentalmente insustituible por otros abordajes. En este artículo, trataremos algunas facetas de la dimensión cromosómica el análisis genético de diversos grupos de organismos.

From the second decade of last century, Argentina has been the epicentre of the beginning and development of the cytogenetics in Latin America. Also, cytogenetics is a discipline characterized by a constant rejuvenation and resurgence, after stages of frank decline of its handling and application. The chromosomal features are deterministic attributes of great predictive value and their study although it requires of certain skill craft practice, it is a fundamental partner tool for new technologies, also powerful, versatile and basically irreplaceable for other approaches. In this article, we will discuss some facets of chromosomal dimension of genetic analysis of different groups of organisms.

■ A MODO DE EXORDIO

La citogenética es el estudio de la estructura, localización y función de los cromosomas, incluyendo el número y forma de los mismos, su comportamiento durante las divisiones celulares, la localización física de genes (secuencias de ADN) en los cromosomas y, más recientemente, las relaciones citogenómicas. Es una disciplina que no puede ser sustituida por otros estudios, tanto en el diagnóstico de patologías cromosómicas como en diversos campos de la investigación biológica, desde la taxonomía, biología celular, evolución, estudios del desarrollo, bio-prospección, conservación biológica de recursos genéticos, hasta su aplicación en la biotecnología como recurso indicador de trazabi-

lidad. En los últimos años, los avances tecnológicos en el área de la citogenética se deben principalmente al desarrollo de nuevas técnicas, tecnologías, insumos y equipamientos, que han resuelto la aplicabilidad rutinaria de ciertos protocolos y el avance de la investigación de precisión. Sin embargo, el *corpus* teórico de la disciplina sigue siendo el centro de atención por parte de profesionales e investigadores. Desde la segunda década del siglo pasado, Argentina ha sido el epicentro del inicio y desarrollo de la citogenética en América latina y grandes maestros han sido los precursores de los grupos de investigación y trabajo actuales (Hunziker, 2000). Como parte de la historia del devenir de la citogenética en el contexto Argentina - Río de la Plata, pueden

consultarse la síntesis 1927- 1999 (Hunziker, 1976, 2000; Hunziker y Sáez, 1976). Actualmente, Argentina dispone de prestigiosos y destacados investigadores citogenetistas, dedicados a las diversas ramas, humana, médica, animal y vegetal.

Dedicado a Eduardo A. Moscone, destacado investigador citogenetista argentino, inspirador del premio Nobel de Medicina 2006, porque apoyados en sus hombros fuertes y generosos, nos permitió ver más lejos.

■ INTRODUCCIÓN

La herencia genética ha cautivado el interés del hombre a lo largo del tiempo. ¿Por qué los hijos se parecen a sus padres o a sus abuelos?

■ Ana Isabel HONFI¹,
Alejandro Daniel BOLZÁN²
y Julio Rubén DAVIÑA³

¹Instituto de Biología Subtropical, nodo Posadas-Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (CONICET-UNaM). Rivadavia 2370. 3300 Posadas, Misiones.
E-mail: ahonfi@gmail.com

²Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE, CCT-CONICET La Plata-CICPBA-UNLP), C.C. 403, 1900 La Plata, Buenos Aires.
E-mail: abolzan@imbice.gov.ar

³Programa de Estudios Florísticos y Genética Vegetal, Instituto de Biología Subtropical, (CONICET-UNaM) nodo Posadas. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Rivadavia 2370. 3300 Posadas, Misiones.
E-mail: juliordavina@gmail.com

¿Dónde se almacena la información hereditaria? ¿Cuáles son los mecanismos por los que se transmiten características, el color de los ojos, de la piel, o del pelo? De acuerdo con Lacadena (1996), *la genética es la ciencia que estudia el material hereditario bajo cualquier nivel (molecular, celular, individual, de poblaciones) o dimensión (analítico-estructural, dinámica, espacio-temporal)*. En cada ser vivo hay una molécula de ADN que tiene muchas unidades llamadas genes, cuyos productos dirigen todas las actividades metabólicas de la célula. El ADN, con su batería de genes, está organizado en cromosomas, estructuras que permiten la transmisión de la información genética. El modo en el que los cromosomas se transmiten de una generación celular a la siguiente, y de los organismos a sus descendientes, tiene que ser extraordinariamente preciso. La citogenética se podría definir como la ciencia que estudia el cromosoma (el material hereditario organizado) bajo cualquier nivel o dimensión (Lacadena, 1996).

■ LOS CROMOSOMAS

El cromosoma es el material genético organizado, que varía en la escala evolutiva, cuya función es conservar, transmitir y expresar la información genética. En el análisis cromosómico, tanto con las técnicas de coloración simples como con las más sofisticadas, la colecta y preparación del material, son pasos fundamentales para la obtención de buenos resultados. El estudio de la estructura externa de los cromosomas de cualquier especie eucariótica consiste en analizar la forma, tamaño y número de los mismos, procedimiento que culmina con la obtención del **cariotipo**. Naturalmente, los cromosomas se pueden estudiar en distintas etapas del desarrollo, según la especie y en función de los objetivos planteados. Las caracterís-

ticas citogenéticas propias de una especie, permiten una descripción detallada que muchas veces otorga identidad cromosómica. El número cromosómico puede ser constante, o presentar variaciones entre las poblaciones o entre individuos de una misma población. Es un parámetro citogenético simple, que permite conocer el grado de variabilidad genética expresada en números, referidos a grupos de cromosomas y grupos de ligamiento. Además, permite determinar si existen polimorfismos naturales de número cromosómico que pueden presentarse como variaciones numéricas de cromosomas individuales (aneuploidías), presencia de cromosomas B, o variaciones numéricas del conjunto cromosómico completo (poliploidía). Los eucariotas superiores poseen dos juegos cromosómicos, uno procedente de cada progenitor. Sin embargo hay especies o individuos que presentan más de dos juegos cromosómicos completos, son los denominados individuos poliploides. Si denominamos como x el número básico de cromosomas que componen un genomio, decimos que el número cromosómico de los individuos diploides es $2n=2x$ al número de cromosomas del organismo. Así, un individuo es poliploide cuando posee como dotación cromosómica tres o más juegos cromosómicos completos. Estas variaciones pueden ser infrecuentes y ocasionales o propias de un taxón.

■ CITOGÉNÉTICA APLICADA A RECURSOS GENÉTICOS NATIVOS

Diversos grupos de investigadores argentinos han realizado esfuerzos para conocer el número cromosómico de las especies de plantas de la flora argentina. Tales estudios, han permitido resolver problemas taxonómicos, comprender acerca de las diferencias y características citogenéticas de las especies, analizar

sus relaciones filogenéticas y entender los procesos evolutivos que han tenido lugar. La diagnosis cromosómica de una especie o de un grupo de especies, permite diseñar las estrategias adecuadas para planes de conservación y uso de determinados recursos vegetales, particularmente si se trata de germoplasma valioso para planes de mejoramiento genético o si fuera el caso de taxones endémicos o raros.

La citogenética es una herramienta útil para caracterizar germoplasma, razón por la cual numerosas especies de interés ornamental que componen la vegetación nativa argentina fueron estudiadas citogenéticamente. Las orquídeas (Orchidaceae Juss.) pertenecen a una de las familias botánicas con mayor número de especies, distribuidas en trópicos y subtrópicos de ambos hemisferios y en Argentina, el NE del país, constituye el área de mayor biodiversidad para la familia (Zuloaga et al., 1999). La mayoría de las especies de orquídeas subtropicales de Argentina poseen valor ornamental por sus vistosas flores como por su aspecto vegetativo, sin embargo, apenas un poco más del 10 % de las especies han sido analizadas cromosómicamente (Daviña et al., 2009).

Las poblaciones naturales de *Aspidogyne kuczynskii* (Porsch) Garay, orquídea terrestre conocida vulgarmente como "hierba de la concordia", poseen $2n=42$ cromosomas (Grabiele et al., 2011b). En las poblaciones naturales de esta especie conviven individuos con distintos patrones de coloración de hojas, las cuales varían desde hojas de color uniforme verde negruzco a variegadas con una banda única central de color blanquecino verduzco o reticuladas de color plateado hasta combinaciones de éstas (Fig. 1). Sin embargo, los individuos que poseen hojas de color uniforme y aquellos



Figura 1: Polimorfismo foliar de *Aspidogyne kuczynskii* en individuos de una misma población que comparten el mismo número cromosómico.

cuyas hojas tienen una única banda central o son reticuladas, no se diferencian a nivel de número cromosómico (Daviña et al., 2009). En este caso, las marcadas variaciones del fenotipo, es decir el polimorfismo foliar, no se correlacionan con distintos números cromosómicos.

Cuando existen evidencias de que en una especie o en un grupo de ellas existen distintos números cromosómicos, el conteo de los mismos es imprescindible antes de iniciar un procedimiento experimental o de conservación biológica a largo plazo. En orquídeas del género *Sarcoglottis*, todas las especies estudiadas hasta el momento poseen $2n=46$ cromosomas, con cariotipo bimodal, constituido por 22 pares cortos y un par largo (Martínez, 1985; Daviña et al., 2009, Grabiele et al.,

2011 a). En una población de *Sarcoglottis fasciculata* de Misiones que posee $2n=46$ cromosomas, se encontró un individuo que además de los 46 cromosomas normales presentó 3 pequeños cromosomas adicionales, denominados cromosomas B (Grabiele et al., 2011b). Estos tres cromosomas adicionales no siempre están presentes en las células del meristema radicular, situación conocida como inestabilidad mitótica. Por esta razón, en las raíces se origina un tejido mosaico constituido por células $2n=46$, $2n=46+1$, $2n=46+2$ y $2n=46+3$ (Grabiele et al., 2011b). Este caso ejemplifica, ausencia de variación fenotípica asociada a variación de índole cromosómica, y evidencia porqué es necesario verificar el número cromosómico de un taxón.

Las especies que poseen cromosomas con morfología adecuadamente identificable, se pueden analizar de acuerdo a diferencias de tamaño, por la posición del centrómero, por las constricciones secundarias, por la presencia de satélites (Daviña y Fernández, 1989; Daviña, 1998; Honfi y Daviña, 1999; Grabiele et al., 2005). El análisis del cariotipo resulta esencial para interpretar las relaciones filogenéticas de evolución cromosómica, establecer las tendencias evolutivas e identificar la condición de ancestralidad (Véase por ejemplo, Bernardello et al., 2008). Sin embargo, la variación en la constitución del cariotipo entre especies relacionadas no es una regla general. En *Hippeastrum*, género que reúne especies bulbosas de flores vistosas, cultivadas en todo el mundo y conocidas popu-

larmente como azucenas o lirios, la condición cromosómica frecuente en la naturaleza es la de un cariotipo conservado en casi todas sus especies (Daviña, 2001). La mayoría de las especies analizadas tienen $2n=2x=22$ cromosomas y también hay representantes naturales triploides ($3x$), tetraploides ($4x$) y pentaploides ($5x$). Los cariotipos haploides son prácticamente conservados y se componen de 4 cromosomas metacéntricos, 4 submetacéntricos y 3 subtelocéntricos ($4m + 4sm + 3st$) (Naranjo y Andrada, 1975; Daviña, 2001).

■ HETEROCROMATINA Y SECUENCIAS DE ADN REVELADA POR FLUOROCROMOS

Cuando los métodos tradicionales no revelan diferencias cariotípicas significativas entre los cromosomas de una misma especie, o entre cariotipos de especies diferentes, existen métodos para mejorar la identificación cromosómica mediante detección de la variación en la intensidad de coloración de la heterocromatina (Daviña y Fernández, 1996; Daviña y Honfi, 2012, 2013). Los bandeos cromosómicos de coloración diferencial y la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con sondas de ADN especiales permiten distinguir regiones cromosómicas útiles como marcadores cromosoma-específicos y especie-específicos. Entre los primeros antecedentes argentinos sobre la aplicación de

técnicas de bandeo cromosómico con CMA_3 (cromomicina) realizados en plantas se registran los trabajos practicados en especies de los géneros *Zephyranthes* (Daviña y Fernández, 1996) e *Hippeastrum* (Daviña, 1999). Las técnicas citogenéticas utilizando fluorocromos, permiten establecer patrones de bandas específicos de heterocromatina constitutiva, y éstas se revelan por tinción directa con fluorocromos que reaccionan dependiendo de la composición de bases nitrogenadas del ADN (Schweizer, 1976, 1981). Los fluorocromos más utilizados en plantas son cromomicina A3 (CMA_3), que colorea regiones ricas en pares GC (guanina y citocina), y el 4'-6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI), que distingue regiones ricas en AT (adenina y timina) (Guerra, 2000). La utilización secuencial de ambos fluorocromos permite caracterizar bloques heterocromáticos como $CMA^+/DAPI^-$, $CMA^-/DAPI^+$ o neutros (Guerra, 2000). Los genes que codifican el ARN ribosómico (ARNr) constituyen una clase abundante de secuencias de ADN repetidas sobre uno o más cromosomas del complemento y han sido utilizados como marcadores específicos para mapear y rotular cromosomas (Maluszynska & Heslop-Harrison, 1993; Seijo et al., 2004). Por ejemplo, en metafase mitótica coloreadas con Feulgen (coloración convencional) en *Hippeastrum puniceum* Lam. (Fig. 2A) se observaron $2n=2x=22$ cromosomas con el cariotipo

formado por 8 cromosomas metacéntricos, más 8 cromosomas submetacéntricos y 6 cromosomas subtelocéntricos y se observó 1 par de cromosomas con un satélite (cuerpo esférico separado del resto por una constricción secundaria) ubicado en el brazo corto del par subtelocéntrico 10. Los cromosomas metafásicos teñidos con cromomicina (CMA_3) muestran fluorescencia diferencial en un segmento heterocromático localizado en el par subtelocéntrico ubicado en la región telomérica (corresponde a la porción terminal de los cromosomas) del brazo corto del par 10 (Fig. 2 B y C). Dicha banda correspondería al satélite ubicado en el mismo brazo de este par cromosómico. Los satélites, en este caso presentan un par de bandas Ag-NOR y CMA_3 coincidentes que sugieren que la región organizadora del nucléolo (Ag-NOR) y los genes ribosomales (ARNr) (es el tipo de ARN más abundante en las células y forma parte de los ribosomas), están asociados a heterocromatina rica en GC dando una banda CMA^+ positiva (Fig. 2C). Mientras que con la coloración con DAPI la misma región heterocromática es DAPI negativa (Fig. 2B) (Cerutti et al. 2008, 2011). Estos estudios citogenéticos permiten identificar a una especie, comprender la biología evolutiva y esclarecer problemas taxonómicos y, muy especialmente, sirven para delinear estrategias de conservación de especies nativas ornamentales que constituyen un recurso genético

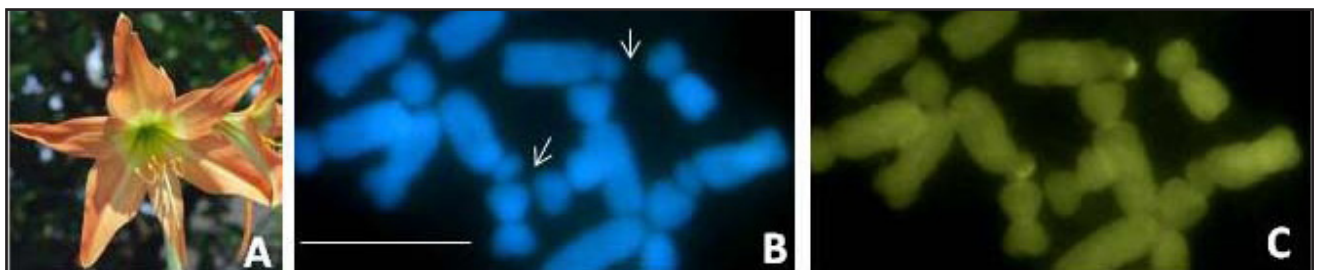


Figura 2: *Hippeastrum puniceum* $2n=2x=22$ cromosomas, A) Flor. B) Detección de heterocromatina mediante bandeo cromosómico ($CMA^+/DAPI^-$). Nótese ausencia de señal con coloración DAPI. C) Coloración con Cromomicina. Nótese señal positiva. La barra representa 5 μ m.

valioso para el país.

■ CROMOSOMAS Y SISTEMA GENÉTICO

En las angiospermas en general, el conjunto de contingencias genético-evolutivas que dieron origen a distintas combinaciones exitosas en la naturaleza, incluyen aspectos cromosómicos (diploidía, poliploidía, series poliploides, cariotipos) y reproductivos (alogamia, autogamia, sexualidad, apomixis) que en conjunto definen los sistemas genéticos presentes en las especies. El *sistema genético* de una especie, es un concepto inicialmente definido por Darlington (1937, 1948), como un sistema de variación hereditaria, o bien, como el conjunto de factores que determinan el balance entre la copia y la variación del genotipo en la reproducción. La descripción del sistema genético de un organismo de reproducción sexual se basa en los procesos de mitosis, meiosis y fecundación de modo que la información necesaria está básicamente relacionada con el número cromosómico, el comportamiento de dichos cromosomas durante la meiosis, el grado de fertilidad de los individuos, el sistema de cruzamiento y/o polinización y el modo reproductivo. Estos factores definen al patrón de comportamiento hereditario de la variabilidad genética de una especie y por lo tanto son útiles e imprescindibles para definir las estrategias adecuadas del mejoramiento genético como de conservación genética de las mismas (Honfi y Daviña, 2014). El sistema genético de una especie es adaptativo puesto que es resultado de la selección natural. Comprende varios subsistemas concernientes a la mutación, desarrollo y otros pero, entre ellos, un subsistema de importancia central es el subsistema de recombinación. Los factores regulatorios de la recombinación en plantas ejercen su control

durante meiosis y la fecundación (Grant, 1975; 1989). El número cromosómico, la frecuencia de entrecruzamientos cromosómicos (*Crossing over*), las barreras de esterilidad, los sistemas de cruzamiento (i.e. alogamia, autogamia), polinización y dispersión son algunos de dichos factores. También, a partir del sistema genético conocido de una especie se logra resolver problemas taxonómicos, comprender procesos evolutivos e identificar relaciones filogenéticas entre especies.

En general, el sistema genético de una especie es el principal determinante de la estructura genética de las poblaciones vegetales y de la variabilidad genética que éstas contienen puesto que, por ejemplo, el sistema de cruzamiento y el nivel de ploidía son condicionantes genéticos y evolutivos para una especie. En un sistema de reproducción sexual ocurre meiosis para originar los gametos y fecundación para formar el cigoto. Durante la *meiosis* el material genético previamente duplicado es distribuido por medio de dos divisiones consecutivas en 4 células hijas, que disponen un conjunto reducido de cromosomas (n). Durante la fecundación, se fusionan 2 gametos con número cromosómico reducido ($n + n$) y se restaura el número cromosómico en el cigoto (embrión, $2n$). En las angiospermas ocurre generalmente doble fecundación, una de ellas encargada de originar el embrión y la otra del endospermo de la semilla. La meiosis, constituye un proceso clave en los organismos de reproducción sexual, porque reduce el número de cromosomas en los gametos que, posteriormente, intervienen en la fecundación y se reconstituye el estado diploide. Por esta razón, el análisis del comportamiento de los cromosomas durante la meiosis es fundamental para predecir la calidad de los gametos, tanto femeninos como masculinos.

Los citogenetistas han estudiado la meiosis desde su primera descripción preliminar (Weissmann, 1887b), más a menudo en plantas e insectos, pero los estudios indican que por sobre todo se trata de un mecanismo altamente conservado en la evolución de los organismos vivos.

La identificación de especies que presentan comportamiento normal durante la meiosis permite utilizarlas como progenitores en planes de cruzamiento, porque de ellas se esperaría, una adecuada formación de gametos balanceados cromosómicamente (Grabiele et al., 2011b). En cambio, una meiosis irregular, puede implicar por ejemplo, cromosomas que no aparean normalmente, segregación anormal con rezagados, cromosomas pegajosos, etc., que finalmente provocan la formación de gametos con un número no balanceado de cromosomas, hecho que disminuirá la fertilidad del organismo. La fertilidad en plantas puede estar afectada por diferentes factores, y entre los de tipo cromosómico, se encuentran las alteraciones estructurales en condición heterocigótica y la falta de apareamiento homólogo en la meiosis, que básicamente modifican el normal desarrollo de las divisiones meióticas, reduciendo la fertilidad gamética y consecuentemente, producen alta esterilidad (Véase por ejemplo, Ferreira et al., 2007). En las investigaciones de información biológica básica y caracterización cromosómica, la meiosis resulta sumamente informativa y de aplicación sustantiva. Por ejemplo, si encontramos comportamiento regular de la meiosis en numerosas especies de orquídeas, de manera que con tales especies se pueden iniciar planes de cruzamiento porque podemos predecir la contribución paterna si las utilizamos como progenitores masculinos (Grabiele et al., 2011 b). Resulta evidente su uso en la conservación de germoplasma de

recursos genéticos como también de la biodiversidad en su conjunto. Las orquídeas del género *Oncidium*, presentan una serie poliploide cuyos niveles de ploidía llegan hasta hexadecaploides (16x), pero en muchas de ellas, se desconoce el comportamiento meiótico, hecho que explicaría la aleatoriedad de los resultados que se han obtenido mediante cruzamientos interespecíficos (Daviña et al., 2009).

Algunos errores durante la meiosis pueden provocar que los cromosomas no se distribuyan equitativamente en las células hijas y por lo tanto, se producen gametos desbalanceados cromosómicamente, o los cromosomas no se separan y originan gametos con un número no reducido de cromosomas ($2n$). Estos gametos $2n$ pueden participar en la fecundación y originar un individuo con un número poliploide de cromosomas. Este comportamiento es frecuente en plantas y más raro en animales. La formación de gametos no reducidos está asociada a fallas del apareamiento cromosómico, huso acromático durante la división celular, a la distorsión de la segregación cromosómica, alteraciones de la cariocinesis, citocinesis y procesos de restitución del núcleo materno. La frecuencia de formación de gametos no reducidos es ocasional y variable en algunas especies, y recurrente en otras, de modo, que en estas últimas, la vía materna y/o paterna, produce regularmente gametos de constitución cromosómica y genética idéntica a la del progenitor. La fecundación mediante gametos no reducidos ($2n$), origina progenie con un número cromosómico mayor y múltiple al de sus progenitores, proceso denominado poliploidización sexual. La progenie resultante, tiene condición poliploide, y si resulta viable e incluso fértil, aumenta la complejidad del sistema genético de la especie y sus posibilidades

evolutivas.

La *poliploidía* es una cualidad cromosómica, donde los portadores disponen de más de dos juegos cromosómicos completos, por ejemplo, en especies de numerosas gramíneas, existen individuos diploides (2 juegos cromosómicos), triploides (tres juegos cromosómicos), tetraploides, hasta n -ploides. De modo general, el menor número de cromosomas encontrado en una especie o grupo relacionado de ellas, suele considerarse el estado no poliploide (con dos veces el número básico de cromosomas, denominado x) y los guarismos múltiples de éste, como estado poliploide. El apareamiento cromosómico durante la meiosis de un poliploide suele utilizarse para conocer el tipo de poliploidía existente, de manera que cuando se observan principalmente bivalentes, se considera alopoliploide estricto (origen interespecífico), en cambio, la presencia de multivalentes indica autopoliploidía (origen intraespecífico). Entre ambos extremos existe una variada gama de situaciones. Por ejemplo, en *Paspalum* (género de gramíneas nativas de interés forrajero), los números cromosómicos de aproximadamente la mitad de las especies indican que la mayoría poseen un número básico de $x=10$ cromosomas, (Honfi et al., 1990; Quarin, 1992; Hojsgaard et al., 2009). La poliploidía tuvo un rol prevaleciente en la especiación de *Paspalum*, los niveles de ploidía comprenden diploides y poliploides, desde triploides hasta infrecuentes hexadecaploides, es rara la ploidía impar y muy frecuente la condición tetraploide (Honfi, 2011). En varias especies de angiospermas se han originado *complejos poliploides*, que pueden definirse como sistemas de hibridización y poliploidía cuyos productos forman una unidad evolutiva dinámica que promueve la diversificación específica (Hojsga-

ard et al., 2014a), y en los cuales el énfasis de estudio se enfoca en los procesos que ocurren en su origen, establecimiento y dispersión, que conducen a la evolución de dicha unidad más que en la clasificación y categorización de individuos o grupos poliploides (Stebbins, 1970). Estos complejos poliploides permiten en la actualidad, identificar procesos evolutivos de interés general, como patrones de cambio cromosómico, mecanismos de poliploidización y de citogeografía evolutiva como por ejemplo, las contribuciones argentinas realizadas con especies de *Turnera* (Solis Neffa y Fernández, 2001; Solis Neffa y Seijo, 2003; Solis Neffa et al., 2003; Solis Neffa, 2010) y *Zephyranthes* (Daviña y Fernández, 1989; Daviña, 2001; Daviña y Honfi, 2011).

La identificación del *modo de reproducción* de una especie vegetal es un paso necesario para comprender el sistema genético que posee en la naturaleza. Las estrategias que generalmente se utilizan para el análisis, comprenden pruebas de progenie, estudio detallado del desarrollo de la megasporogénesis y megagametogénesis (formación del saco embrionario), identificación de marcadores bioquímicos y moleculares asociados a un modo reproductivo en particular y también la identificación y análisis de los genes específicos (Ortiz et al., 2013, Zilli et al., 2014). En muchas especies e incluso géneros completos, existe una asociación estrecha entre niveles de ploidía y modos de reproducción, por ejemplo, es conocido que las especies diploides se reproducen sexualmente, con raras excepciones. La *apomixis* es un proceso biológico de clonación natural por el cual se generan embriones sin fecundación, genéticamente idénticos a la planta madre; es decir un sistema de reproducción asexual por medio de verdaderas semillas (Nogler, 1984). Con

técnicas de coloración apropiada se pueden obtener señales bioquímicas marcadoras que permiten diferenciar el desarrollo sexual de uno de tipo apomítico, por ejemplo, mediante el reconocimiento de depósitos de calosa en los meiocitos femeninos durante la megasporogénesis (Rodkievics, 1970; Honfi, 2003). La apomixis ha sido observada en numerosas especies de gramíneas, siempre asociada a poliploidía. En algunas especies de *Paspalum* por ejemplo, además de los poliploides apomíticos existen contrapartes diploides de reproducción sexual (Ortiz et al., 2013). El comportamiento reproductivo en éstas especies puede exhibir procesos exclusivamente sexuales; combinaciones de sexualidad y apomixis; hasta apomixis únicamente. Un *complejo poliploide agámico* puede definirse como una asociación entre citotipos sexuales y contrapartes apomíticas que poseen niveles de ploidía diferentes, en la mayoría de los casos, diploides y tetraploides respectivamente (Savidan, 2000). Los complejos agámicos pueden surgir mediante procesos de autoploidía en una especie o involucrar especies distintas que originan aloploidios a través de hibridación (Nogler, 1984; Asker y Jerling, 1992). Las investigaciones cromosómicas asociadas al diagnóstico del modo reproductivo de una especie, variedad o cultivar, no son meramente descriptivas, sino al contrario, resultan de valor predictivo porque el sistema genético de una especie consiste en la integración de procesos genéticos, cromosómicos y reproductivos, cuya consecuencia inmediata es la fertilidad y a largo plazo, la permanencia evolutiva.

A partir de análisis comparativos de los cariotipos e hitos cromosómicos, se logran establecer patrones de evolución cromosómica y éstos permiten determinar una trayectoria evolutiva posible. Por ejemplo,

en una especie, con dos citotipos, uno de condición diploide y otro tetraploide, el cariotipo y el comportamiento meiótico son la evidencia que detecta el origen del poliploide. Un origen autoploidio se basa en la observación de alta homología entre los cromosomas que se comportan apareando como cuadrivalentes y un cariotipo constituido por cuartetos de cromosomas homólogos, como ocurre en *Paspalum almum* (Sader y Honfi, 2007). En este ejemplo, la trayectoria evolutiva inicia desde el diploide al tetraploide, el mecanismo involucrado es la poliploidización intraespecífica con participación de gametos no reducidos. Temporalmente el origen del neopoliploide es un proceso breve, evolutivamente instantáneo, cuyo establecimiento puede tomar muy pocas generaciones.

Los mecanismos específicos que intervienen en la evolución cromosómica comprenden diversas alteraciones estructurales y numéricas. Su importancia relativa depende de los grupos taxonómicos en consideración, por ejemplo en gramíneas, orquídeas y compuestas, la poliploidía tiene preponderancia, en cambio las translocaciones (intercambio de segmento entre dos cromosomas no homólogos) son relevantes por ejemplo, en especies de Onagráceas y Comelináceas (Grabiele et al., 2012). La evidencia cromosómica permite inferir cuáles han sido las etapas de cambio cromosómico de interés evolutivo a la vez que resulta genéticamente informativa, dado que las alteraciones estructurales de los cromosomas tienen como consecuencia el reordenamiento de grupos de ligamiento de genes, rediseñándolos y afectando su potencial de expresión, que en casos particulares llegan a originar grandes regiones libres de recombinación (supergenes) que se comportan como una unidad hereditaria y en otros casos

afectan la cantidad de ADN existente en el núcleo celular. El *tamaño del genoma* puede medirse en pares de bases nitrogenadas del ADN que lo constituye (pb), en unidades volumétricas (picogramos) o en unidades métricas como el largo total del complemento cromosómico (micras). Es un parámetro comparativo entre especies e indicador de procesos evolutivos tales como la adición o pérdida de ADN durante la evolución de las especies. Un aspecto que ha llamado mucho la atención a los investigadores ha sido el vínculo entre el nivel de ploidía, el cariotipo y el tamaño del genoma, particularmente, cuando no existe correlación evidente entre las variaciones de tamaño entre estos parámetros (Poggio et al., 2014; Galdeano et al., 2016). En la actualidad, utilizando citometría de flujo, es posible determinar las cantidades relativas y/o absolutas del contenido de ADN en el núcleo celular, de diferentes tejidos, de modo que grandes cantidades de núcleos en suspensión pueden ser analizados rutinariamente y luego, correlacionar esta información con el número cromosómico, cariotipo, nivel de ploidía presente y modo reproductivo (Galdeano et al., 2016). La citometría de flujo es una técnica que permite el estudio de múltiples parámetros de partículas micrométricas, principalmente células en suspensión y en flujo continuo, a través de un proceso de interrogación individual de cada núcleo teñido con colorantes fluorescentes. Esta nueva estrategia permite disponer de datos con alto valor estadístico y aumentar la celeridad de análisis que hoy rutinariamente se realizan con técnicas que insumen mucho tiempo y esfuerzo, por ejemplo, análisis del nivel de ploidía de poblaciones naturales, de colecciones de germoplasma, cultivos implantados, entre otros (Galdeano et al., 2016).

■ CITOGENÉTICA Y MUTAGÉNE- SIS: LAS ABERRACIONES CROMO- SÓMICAS.

Uno de los campos de estudio más importantes dentro de la citogenética es el dedicado a las aberraciones o anomalías cromosómicas inducidas por agentes mutagénicos (es decir, que generan daño genético, ya sea a nivel citogenético (cromosomas) o molecular (ADN)). El agente mutagénico puede ser de naturaleza física (como los rayos X), química (como las drogas antitumorales) o biológica (como los virus). Las aberraciones cromosómicas pueden ser numéricas (como la poliploidía o la aneuploidía) o estructurales (como, por ejemplo, un cromosoma en forma de anillo). En el caso de las aberraciones cromosómicas que afectan la estructura del cromosoma, hablamos de reordenamientos cromosómicos, ya que implica una reestructuración del cromosoma y el agente mutagénico recibe entonces el nombre genérico de "clastógeno" (del griego, *clasto* = quebrar o romper y *genos* = engendrar o producir; Shaw, 1970), pues induce aberraciones cromosómicas por ruptura del cromosoma. Las aberraciones cromosómicas estructurales pueden ser estables o inestables, es decir, permanecer o no en el tiempo a lo largo de las sucesivas divisiones celulares, dependiendo de si el cromosoma reordenado mantiene su centrómero o constricción primaria y sus telómeros o extremos (en este caso la aberración es estable, como por ejemplo las translocaciones recíprocas y las inversiones) o pierde su centrómero (fragmento acéntrico) o sus telómeros (formando generalmente un cromosoma en anillo) o posee más de un centrómero (como es el caso de un cromosoma dicéntrico, es decir, con dos centrómeros), todas ellas aberraciones inestables. La importancia de estudiar el daño inducido por un agente clastogénico,

radica en que la generación de daño a nivel cromosómico puede ocasionar, la muerte de la célula afectada o llevar al desarrollo de células tumorales, las cuales se caracterizan, entre otras cosas, por poseer aberraciones cromosómicas estructurales, especialmente translocaciones, ya sean recíprocas (se producen por roturas en dos cromosomas diferentes y el consiguiente intercambio de material genético entre ambos) o no (en este caso, hablamos de una inserción, pues una porción de un cromosoma se inserta en otro cromosoma sin que este último le ceda material genético, es decir, no hay reciprocidad). En otras palabras, la aparición de aberraciones cromosómicas estructurales, favorece el desarrollo de cáncer. Asimismo, si el daño cromosómico afecta a las células de la línea germinal, entonces el daño se transmite a la descendencia de los progenitores en cuestión, si las gametas que intervienen en la formación del cigoto (óvulo fecundado, que luego se transforma en embrión), resultan afectadas. Por ello, el estudio del daño cromosómico inducido por diversos agentes mutagénicos, resulta de gran interés para la salud humana. Dichos estudios comprenden tanto a individuos laboral o accidentalmente expuestos a radiaciones u otros mutágenos, como a aquellos que, por razones médicas, son sometidos a una radio- o quimioterapia. Si bien el daño inducido puede afectar a distintas partes o regiones del cromosoma (su constricción primaria o centrómero, sus extremos o telómeros, o la región entre el centrómero y el telómero) (Figura 3: Partes del cromosoma), en las últimas dos décadas ha habido un interés creciente en los extremos cromosómicos. En el siguiente apartado veremos el porqué de ello.

■ ¿QUÉ SON LOS TELÓMEROS? ¿CUÁL ES SU FUNCIÓN?

Telómero (del griego, *telo* = extremo, y *mero* = parte) es un término acuñado en 1938 por el genetista Hermann Joseph Muller, para describir a los extremos de los cromosomas. Sin embargo, el concepto de "telómero" se utilizaba en esa época no sólo para referirse a los extremos físicos de los cromosomas, sino también a "un gen terminal con una función especial, la de sellar el extremo del cromosoma" (Muller, 1938). En este sentido, los telómeros fueron definidos como las regiones terminales o extremos físicos de los cromosomas eucarióticos, que protegen a los mismos de la fusión con otros cromosomas (ya sea con un fragmento cromosómico o con uno o ambos extremos de otro cromosoma). Es decir, estaba claro que el cromosoma tenía dos extremos y que los mismos debían tener necesariamente una función protectora. Hoy en día, a la luz de diversos estudios de biología molecular, los telómeros son definidos como complejos nucleoproteicos especializados, compuestos por ADN (de secuencia variable, según el organismo de que se trate), ARN (denominado TERRA, por su significado en inglés *Telomeric Repeat Containing RNA*, pues contiene repetidos de secuencia UUAGGG) y proteínas asociadas (el denominado complejo shelterina o telosoma, formado por seis proteínas, a las que se asocian además, varias proteínas relacionadas con la respuesta celular al daño y reparación del ADN), que se encuentran localizados en los extremos físicos de los cromosomas eucarióticos y tienen como función mantener su estabilidad e integridad, protegiéndolos de la degradación por nucleasas y de la recombinación y fusión con otros cromosomas (O'Sullivan y Karlseder, 2010). Por lo tanto, el mantenimiento de la función telo-

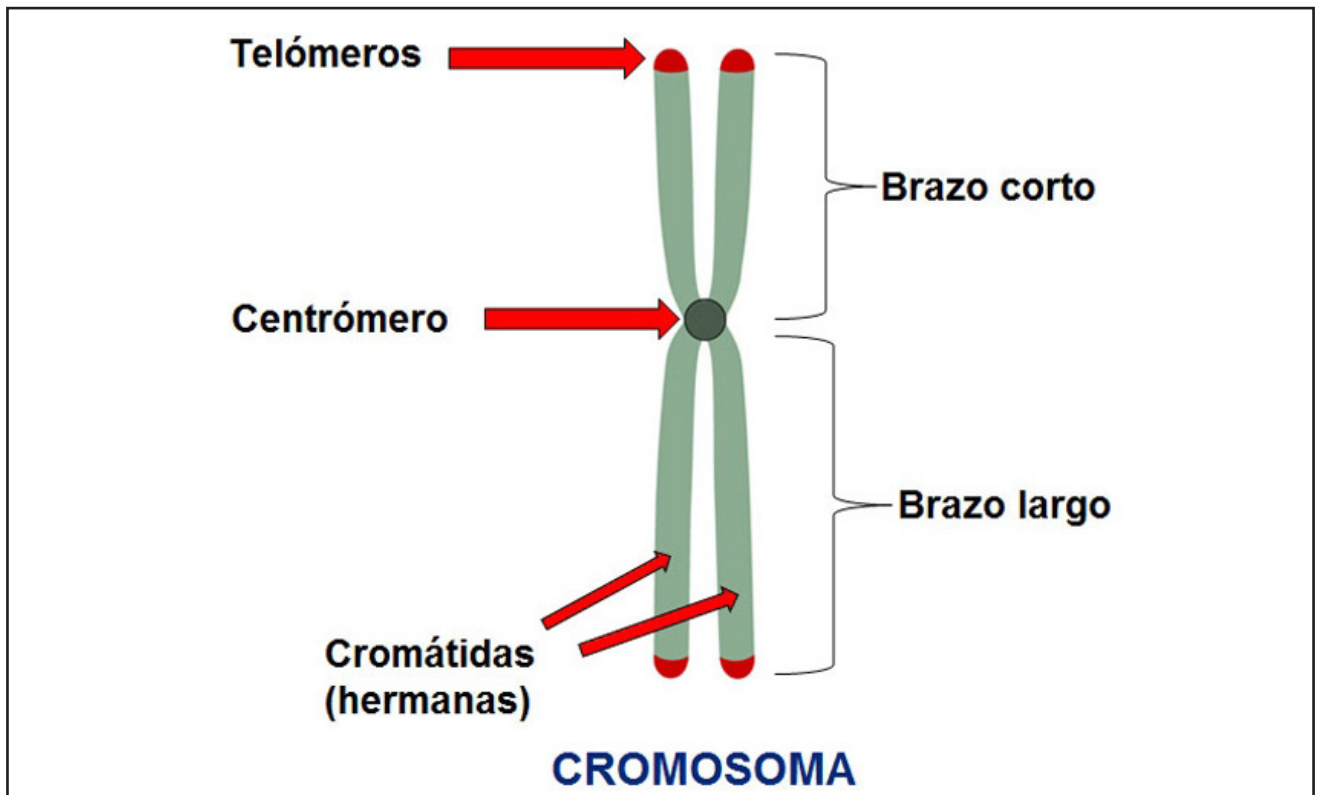


Figura 3: Partes de un cromosoma. Se indica en un hipotético cromosoma en metafase, el centrómero o constricción primaria, los telómeros o extremos, los brazos (dos por cada cromosoma) y las cromátidas. La cromátida es la unidad estructural y funcional del cromosoma; cada cromosoma en metafase presenta dos cromátidas, llamadas hermanas por pertenecer a un mismo cromosoma. Las cromátidas son entonces cada una de las mitades de un cromosoma duplicado.

mérica es fundamental para la estabilidad genómica y la viabilidad celular. En efecto, las células que presentan telómeros disfuncionales –ya sea debido a desprotección o erosión o desgaste excesivo de los mismos– experimentan senescencia, muerte celular o inestabilidad genómica, fenómeno este último estrechamente ligado con el proceso de cáncer (O’Sullivan y Karlseder, 2010; Murnane, 2012). Las denominadas asociaciones y fusiones teloméricas en particular, están implicadas en los procesos de inestabilidad cromosómica y desarrollo tumoral en humanos (Murnane, 2012). Dado que los telómeros se acortan durante las sucesivas divisiones celulares (debido a que la enzima ADN polimerasa no es capaz de copiar el ADN de los extremos cromosómicos), existe una enzima denominada

telomerasa que compensa el acortamiento, sintetizando repetidos teloméricos utilizando un ARN propio como templado o molde para dicha síntesis (Jafri et al., 2016). Esta enzima se halla presente en líneas celulares inmortales, células de la línea germinal, células madre, linfocitos activados y la mayoría de las células tumorales, en cambio se encuentra inactiva en la mayoría de las células somáticas (de ahí el acortamiento progresivo de los telómeros en estas células) (Gomes et al., 2010).

Si bien los telómeros son conocidos desde hace mucho tiempo, fueron sin duda los estudios llevados a cabo a nivel citogenético y molecular durante las últimas dos décadas, los que llevaron al descubrimiento de la gran importancia que tienen para el mantenimiento de la estabi-

lidad cromosómica y la viabilidad celular.

■ EL ESTUDIO CITOGÉNÉTICO DE LOS TELÓMEROS

Si bien es posible estudiar a los telómeros con técnicas de citogenética clásica (técnica de bandedo T), éstas proveen información limitada acerca de los reordenamientos cromosómicos que involucran a los telómeros, ya que no permite obtener información precisa a nivel molecular (es decir, sobre el ADN telomérico y en particular sobre la distribución de las secuencias teloméricas en los cromosomas y sus anomalías). Hoy en día, a partir de los avances producidos en lo que se denomina “citogenética molecular” (el estudio de los cromosomas y sus anomalías utilizando secuencias de

ADN marcadas con un colorante fluorescente), el estudio citogenético de los telómeros se lleva a cabo a través de la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (más comúnmente conocida como FISH, por sus siglas en inglés) y sus diversas variantes (Bolzán, 2012). Esta técnica consiste en la identificación de secuencias específicas de ADN *in situ* (en cromosomas en metafase o núcleos en interfase), con una secuencia complementaria de ácido nucleico (sonda) marcada con un colorante fluorescente, de modo que la ubicación de esas secuencias pueda ser visualizada mediante un microscopio de fluorescencia. En este caso, se trata de una sonda con la secuencia de ADN complementaria a la de los telómeros que, si bien varía en los distintos grupos de organismos eucariotas, en todos los vertebrados consiste en el hexanucleótido TTAGGG repetido n veces (Meyne et al., 1989). De este modo, mediante el uso de una sonda telomérica marcada con un colorante fluorescente, es posible identificar la ubicación precisa en cada cromosoma, de las secuencias de ADN que forman parte del telómero (recordemos que el telómero es una estructura que contiene además proteínas y ARN). La sonda que se utiliza para estudiar a los telómeros, se denomina generalmente “pantelomérica” (del griego, *pan* = todo), pues permite identificar simultáneamente a todos los telómeros de los cromosomas de una célula. Es importante señalar que las sondas comerciales que habitualmente son identificadas como teloméricas o telómero-específicas, son en realidad sondas que hibridan con regiones subtelo-méricas de cromosomas específicos, pero no con el ADN telomérico.

Los estudios de aberraciones teloméricas se llevan a cabo en células en la etapa del ciclo celular denominada metafase (cuando los cro-

mosomas se hallan en su máximo grado de condensación y son por ello fácilmente visibles e identificables). Luego de aplicada la técnica de FISH con sonda telomérica, cada cromosoma presenta normalmente cuatro señales fluorescentes, correspondientes cada una al telómero (o más precisamente al bloque o agrupamiento de secuencias repetidas de ADN telomérico) de cada cromátida y brazo cromosómico (recordemos que normalmente cada cromosoma posee dos brazos -llamados brazo corto y brazo largo- y cada cromosoma en la etapa de metafase presenta dos cromátidas; las cromátidas son las unidades estructurales de los cromosomas) (Figura 4: Ubicación de las señales teloméricas en

un cromosoma normal en metafase). Es importante agregar aquí, que las secuencias teloméricas pueden encontrarse ubicadas no sólo en los extremos de los cromosomas, sino también en el centrómero o entre el centrómero y el telómero. En este caso, se denominan secuencias teloméricas intersticiales y son frecuentes en diversas especies de vertebrados y otros organismos (Meyne et al., 1990; Lin y Yan, 2008; Ruiz-Herrera et al., 2008). Su importancia radica en que la presencia de dichas secuencias es considerada la resultante de reordenamientos cromosómicos, algo sobre lo cual volveremos más adelante.

Dependiendo entonces del efec-

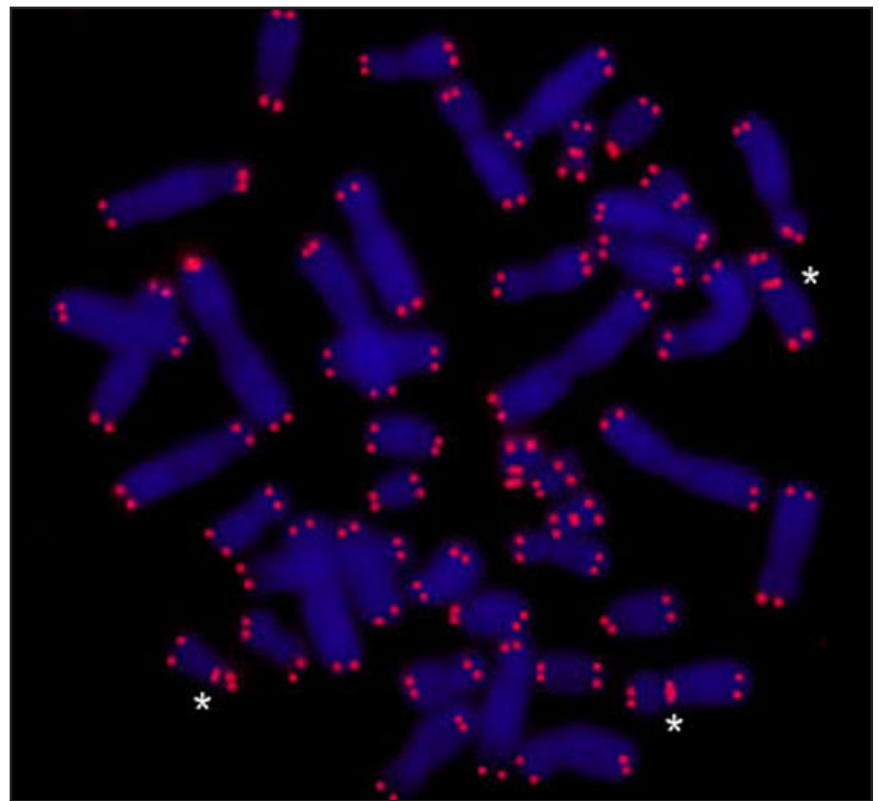


Figura 4: Fotografía de una célula en metafase de conejo doméstico obtenida luego de aplicar la técnica de FISH con sonda telomérica. Se observan en color rojo las señales teloméricas, tanto terminales (se observan las características 4 señales por cromosoma, 2 por cada extremo) como intersticiales (a modo de ejemplo, se indican mediante un asterisco tres de ellas), ya que este tipo de células presenta también algunas señales por fuera de los telómeros, en regiones centroméricas.

to que un determinado mutágeno pueda tener sobre los cromosomas, aparecen distintos tipos de aberraciones estructurales a nivel telomérico (Bolzán y Bianchi, 2006; Bolzán, 2012). Asimismo, investigaciones desarrolladas por otros investigadores han permitido establecer que la disminución de la longitud telomérica puede estar asociada al aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas numéricas (Pampalona et al., 2010; Tamayo et al., 2011). Entre las aberraciones estructurales que involucran a los

telómeros se destacan, los cromosomas incompletos (es decir, que han perdido uno o ambos extremos), los fragmentos acéntricos (sin centrómero) en sus distintas variantes (terminal, intersticial o compuesto), las asociaciones o fusiones teloméricas y la amplificación o translocación de secuencias teloméricas (Tabla 1: Listado de los distintos tipos de aberraciones cromosómicas que involucran a los telómeros y secuencias teloméricas intersticiales) (Bolzán, 2012). Es importante señalar que esta clase de aberraciones son im-

posibles de identificar mediante las técnicas de citogenética convencional, de ahí el gran aporte de la citogenética molecular al conocimiento de las aberraciones cromosómicas que involucran a los telómeros y del rol que las secuencias teloméricas tienen en la formación de reordenamientos cromosómicos. De este modo, mediante el estudio citogenético de los telómeros, es posible hoy en día determinar si las células bajo estudio presentan sus telómeros funcionalmente estables, inestables o disfuncionales. Asimismo, es posible

Tabla 1.

Aberraciones cromosómicas que involucran a los telómeros y secuencias teloméricas intersticiales

A. Aberraciones que involucran directamente a los extremos cromosómicos y, como consecuencia de ello, a las secuencias teloméricas terminales. Involucran la pérdida de uno o más telómeros, como consecuencia de rupturas cromosómicas a nivel de los extremos cromosómicos.

-Cromosomas incompletos (cromosomas que pierden uno o ambos extremos).

-Fragmentos acéntricos terminales (es decir, que derivan de rupturas en los extremos del cromosoma). Estos fragmentos pueden unirse y formar un fragmento combinado o compuesto. Asimismo, existen fragmentos acéntricos derivados de dos rupturas a nivel de la región intersticial de los cromosomas, por lo cual carecen de telómeros y son denominados intersticiales.

-Cromosomas dicéntricos o multicéntricos (con más de dos centrómeros) que han perdido uno o ambos extremos.

B. Aberraciones cromosómicas que involucran directamente a las secuencias teloméricas terminales o propiamente dichas e implican disfunción telomérica. No hay involucrado un evento de ruptura cromosómica.

-Pérdida o multiplicación (generalmente por duplicado o triplicado) de uno más telómeros (entendiendo como tal al grupo de secuencias de ADN telomérico del cromosoma, el cual se identifica citogenéticamente mediante FISH como una señal fluorescente) del cromosoma.

-Asociación telomérica (señales de FISH muy juntas, pero no unidas; se observan entonces cuatro señales de FISH en el sitio de la asociación).

-Fusión telomérica (con o sin señales de FISH en el sitio de fusión o unión de los cromosomas).

-Intercambios de cromátidas hermanas a nivel telomérico (lo que indica un evento de recombinación a nivel telomérico).

-Translocación de secuencias teloméricas terminales.

-Amplificación de secuencias teloméricas terminales.

C. Aberraciones cromosómicas que involucran a las secuencias teloméricas intersticiales.

-Translocación o cambio de posición de secuencias teloméricas intersticiales.

-Amplificación o incremento en el número o en el tamaño del bloque de secuencias teloméricas intersticiales.

-Pérdida de secuencias teloméricas intersticiales.

-Fragmento intersticial (derivado de rupturas a nivel de la región centromérica o pericentromérica de un cromosoma que contiene uno o más bloques de estas secuencias).

determinar si éstas células presentan secuencias teloméricas de posición intersticial (es decir, en la región pericentromérica o entre el centrómero y el telómero), lo cual aporta información adicional sobre los posibles reordenamientos cromosómicos presentes en la célula y sus mecanismos de formación (mayormente, fusiones o fisiones cromosómicas).

La inestabilidad telomérica puede surgir cuando un cromosoma, debido a una ruptura en uno a ambos extremos, pierde uno o ambos telómeros (es decir, se vuelve un "cromosoma incompleto") y, por lo tanto, los extremos del cromosoma "cortado" o roto quedan expuestos a la acción de enzimas que pueden degradarlos o tienden a fusionarse con los extremos de otro cromosoma. En este caso, hablamos de inestabilidad telomérica por pérdida de telómeros o extremos cromosómicos (Figura 5). Alternativamente, puede suceder que los telómeros del

cromosoma en cuestión se acorten en exceso (más allá del acortamiento natural de los telómeros con el tiempo, fenómeno que ocurre habitualmente en las células somáticas), lo cual predispone a los cromosomas a fusionarse o asociarse entre sí. Esto puede afectar a cualquiera de los cuatro telómeros de un cromosoma en metafase, dando lugar a cromosomas con pérdida de señales teloméricas (cada señal de FISH representa un bloque o conjunto específico de secuencias teloméricas) (Figuras 6A y B). También puede darse el caso de que se altere o pierda alguna de las proteínas teloméricas (del complejo shelterina) o el ARN telomérico. En estos casos hablamos de inestabilidad telomérica por disfunción del telómero, pues el mismo ha perdido su función protectora, ya sea por acortamiento excesivo (proceso llamado "erosión telomérica") o por pérdida o alteración de sus proteínas o del ARN asociado al ADN telomérico (Bolzán, 2012).

La disfunción telomérica puede ser estudiada a nivel citogenético mediante FISH y resulta visible a través de aberraciones cromosómicas tales como fusiones teloméricas, asociaciones teloméricas o la pérdida o duplicación de señal telomérica (Figuras 6A-F). Las duplicaciones de señales teloméricas en particular, pueden deberse a la unión de un telómero roto con uno disfuncional o a un evento de amplificación o recombinación telomérica a nivel local (Bolzán, 2012). Cabe agregar que el desarrollo actual de la técnica de FISH permite, mediante el uso de las llamadas sondas de tipo PNA (de *Peptide Nucleic Acid*), determinar la longitud telomérica o el tamaño de las regiones ricas en secuencias teloméricas intersticiales de los cromosomas bajo estudio, ya que este tipo de sondas emite una señal de fluorescencia cuya intensidad es directamente proporcional al número de repetidos teloméricos presentes (Poon et al., 1999). Esta variante de

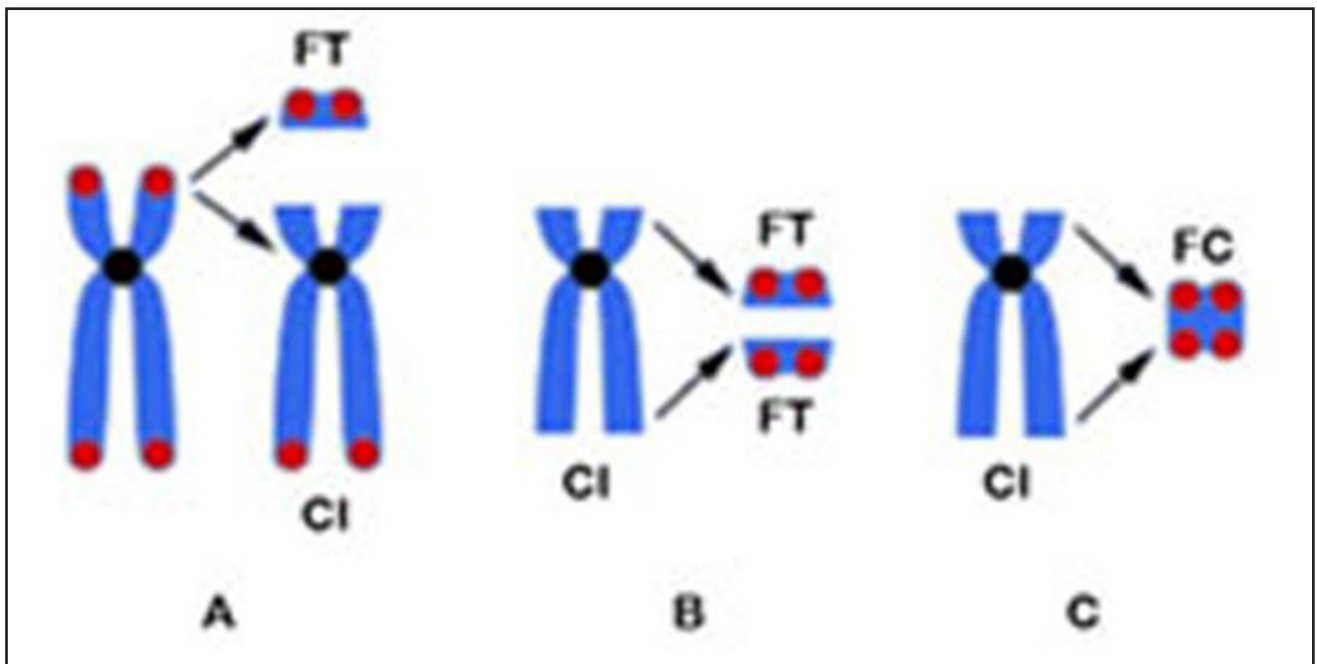


Figura 5: Esquema que ejemplifica como se observa un cromosoma en metafase que resulta de una ruptura en uno (caso A) o ambos (casos B y C) de sus extremos. CI, cromosoma incompleto; FT, fragmento terminal; FC, fragmento compuesto o combinado (ver texto para más detalles). Se indica en color negro el centrómero y en color rojo los telómeros de los cromosomas.

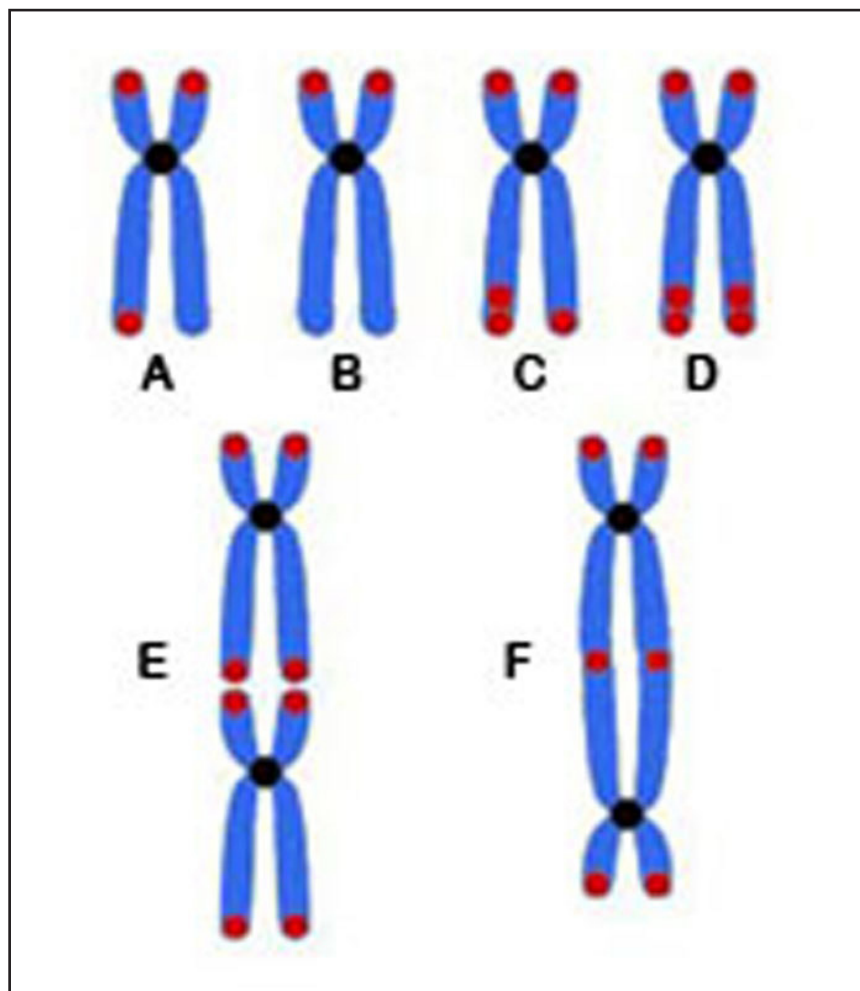


Figura 6: Esquema que ejemplifica como se observa un cromosoma en metafase con pérdida (en una o ambas cromátidas, casos A y B) o duplicación (en una o ambas cromátidas, casos C y D) de señales teloméricas, una asociación telomérica (caso E) y una fusión telomérica (caso F) (ver texto para más detalles). Se indica en color negro el centrómero y en color rojo los telómeros de los cromosomas.

la técnica de FISH se denomina Q-FISH (por *Quantitative FISH*) o FISH cuantitativo.

Como vemos, entonces, la citogenética permite actualmente determinar si una célula presenta o no inestabilidad telomérica y si la misma es debida a ruptura del cromosoma o a disfunción del telómero.

■ LAS INVESTIGACIONES EN CITOGENÉTICA Y TELÓMEROS EN EL PAÍS

En nuestro país existen grupos de

investigación dedicados al estudio molecular de los telómeros, tales como los liderados por la Dra. Irma Slavutsky (IMEX, Academia Nacional de Medicina) y por el Dr. Daniel Gómez (Lab. de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes), cuyos trabajos están orientados a analizar la actividad de la telomerasa, el acortamiento telomérico y/o la expresión de genes teloméricos (u otros asociados al mantenimiento de los telómeros) en relación al desarrollo y tratamiento del cáncer (véase por ejemplo Dos Santos et al., 2015, Panero et al., 2015 y Mengual

Gómez et al., 2016). El único grupo de investigación de nuestro país dedicado al estudio citogenético de los reordenamientos cromosómicos inducidos que involucran a los telómeros en sentido estricto (es decir, el ADN telomérico) y secuencias teloméricas intersticiales mediante FISH, es el del Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis del IMBICE.

Dado que diversos mutágenos químicos son utilizados comúnmente como agentes antitumorales, el análisis de la inestabilidad cromosómica inducida a corto y largo plazo por dichos agentes resulta de gran importancia para comprender la inestabilidad genómica habitualmente asociada con los tratamientos quimioterapéuticos. Por lo tanto, debido al rol que cumplen los telómeros en el mantenimiento de la estabilidad genómica, el conocimiento acabado de los efectos de los mutágenos químicos con propiedades antitumorales sobre los telómeros, resulta fundamental para una evaluación apropiada, de la eficacia terapéutica de esta clase de compuestos. Es por ello que hace aproximadamente 15 años atrás, se inició en el Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis del IMBICE una línea de trabajo que tiene por objeto analizar los efectos *in vitro* de los antibióticos antitumorales bleomicina (BLM), estreptonigrina (EN) y estreptozotocina (EZ) sobre los telómeros y secuencias teloméricas intersticiales de los cromosomas de diversas especies de mamíferos, utilizando la técnica de FISH con sonda telomérica. En primer término, se estudió la relación entre secuencias teloméricas terminales e intersticiales y aberraciones cromosómicas inducidas por BLM y EN en células de hámster chino (Bolzán et al., 2001). Posteriormente, se investigó la inducción de los llamados elementos cromosómicos incompletos (que carecen de uno o ambos telómeros)

por BLM, EN y EZ (Bolzán y Bianchi, 2004a y b; Bolzán y Bianchi, 2005; Díaz-Flaqué et al., 2006) en células de mamífero, siendo las publicaciones resultantes las primeras a nivel mundial acerca de la inducción de elementos cromosómicos incompletos por mutágenos químicos. Más recientemente, se estudiaron los efectos de la BLM, EN y EZ sobre las secuencias teloméricas intersticiales de células de ovario de hámster chino (Sánchez et al., 2009, 2010; Quiroga et al., 2013). Los trabajos realizados permitieron concluir que las regiones cromosómicas que contienen secuencias teloméricas están preferentemente involucradas en fenómenos de ruptura y recombinación por BLM y EN y que la aparición de aberraciones cromosómicas incompletas (que indica falta de reparación del daño cromosómico inducido) es un fenómeno muy frecuente en células tratadas con antibióticos antitumorales. Asimismo, se encontró que los compuestos BLM y EN inducen amplificación y translocación de secuencias teloméricas, aunque se desconocen los mecanismos involucrados y también rupturas a nivel de las regiones cromosómicas centroméricas ricas en secuencias teloméricas intersticiales, aunque dichas regiones no son el blanco preferencial de su acción clastogénica. Las investigaciones más recientes han estado orientadas a investigar los efectos a largo plazo de la BLM, la EN y la EZ sobre los telómeros y secuencias teloméricas intersticiales de células animales (rata y hámster chino). Encontramos que la BLM y la EN inducen inestabilidad telomérica (sea por pérdida de extremos cromosómicos, sea por disfunción telomérica) al menos hasta 15 días postratamiento y de secuencias teloméricas intersticiales (principalmente translocación o amplificación de estas secuencias) hasta 30 días postratamiento, en células de rata (Vidal Bravo et al., 2012;

Mencucci et al., 2012; Paviolo et al., 2012 y 2014). Asimismo, la EZ induce disfunción telomérica persistente (hasta 15 días postratamiento) en células de rata (Paviolo et al., 2015). Es decir, los antibióticos antitumorales tienen un efecto residual sobre los telómeros y secuencias teloméricas intersticiales. Actualmente, los estudios están centrados en analizar la inestabilidad telomérica inducida por los compuestos mencionados en células humanas y los posibles mecanismos involucrados en dicha inestabilidad.

■ ESTUDIOS DE EVOLUCIÓN CROMOSÓMICA Y TELÓMEROS EN VERTEBRADOS DE LA ARGENTINA

Además de los estudios mencionados, cabe agregar que la aplicación de la técnica de FISH con sonda telomérica en el Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis del IMBICE, ha permitido realizar varios estudios en colaboración con otros grupos de investigación de nuestro país sobre la distribución de las secuencias teloméricas en los cromosomas de diversas especies de vertebrados (ya sea a nivel de los extremos cromosómicos o de posición intersticial, es decir en la región centromérica o entre el centrómero y el telómero) y su posible relación con la evolución cromosómica de las mismas. De este modo, se llevaron a cabo estudios sobre evolución cromosómica en roedores, armadillos, monos del nuevo mundo y tortugas (Lizarralde et al., 2003, 2005; Mudry et al., 2007; Steinberg et al. 2008; Martínez et al., 2009; Sánchez et al., 2015 y Lanzzone et al., 2016). A lo anterior, cabe agregar el estudio reciente del grupo de la Dra. Liliana Mola (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires) sobre distribución de secuencias teloméricas en los cromosomas de escorpiones (Adilardi

et al., 2015). Todos estos estudios aportaron datos importantes en relación al posible rol de las secuencias teloméricas en la evolución cromosómica de las especies estudiadas.

■ EL DERROTERO Y FUTURO

En conclusión, el estudio citogenético de los telómeros mediante la técnica de FISH y sus variantes permite determinar con mayor precisión el daño inducido a nivel cromosómico por un mutágeno dado y si un agente mutagénico induce inestabilidad telomérica, ya sea por pérdida de extremos cromosómicos o por disfunción telomérica. Es así que, a pesar de los grandes avances en genética y biología molecular, estudios recientes demuestran que la citogenética sigue siendo una herramienta fundamental para complementar los estudios moleculares, especialmente en el área de telómeros. En efecto, mediante los estudios citogenéticos es posible corroborar y ampliar los análisis moleculares tendientes a determinar la existencia de disfunción telomérica, como lo demuestra, por ejemplo, un trabajo reciente (Rai et al., 2016) publicado en la prestigiosa revista *Nature Communications*, en el cual se incluyeron estudios citogenéticos para identificar fusiones cromosómicas con y sin secuencias teloméricas intervinientes e intercambios de cromátidas hermanas a nivel telomérico. Ello demuestra que, en las investigaciones sobre telómeros, la citogenética continúa vigente y es un complemento importante de los estudios a nivel molecular (los cuales permiten determinar ciertos parámetros que no son posibles de establecer mediante FISH, tales como los relacionados con las proteínas y el ARN asociado al ADN telomérico). Asimismo, los estudios colaborativos mencionados en este artículo y muchos otros desarrollados a nivel mundial por otros grupos de investigación, demuestran que el

estudio de la distribución cromosómica de las secuencias teloméricas puede aportar datos importantes en cuanto a los eventos cromosómicos producidos durante la evolución cromosómica o cariotípica de distintas especies animales.

La citogenética es una disciplina que se caracteriza por su capacidad de constante rejuvenecimiento y resurgimiento, aun después de etapas de franca declinación de su manejo y aplicación. Los rasgos cromosómicos de una entidad no dependen de la expresión génica, condiciones ambientales, edad, fase del desarrollo ni otros factores que puedan confundirlos (Acosta et al., 2016), cualidad determinística que tiene gran valor predictivo. Aunque requiere de cierta práctica artesanal, resulta una herramienta fundamental para tecnologías de vanguardia, por ejemplo, para la confección de mapas citogenómicos, para ubicar con precisión sitio específica datos genómicos obtenidos por secuenciación y relacionar con los mapas genéticos producidos por análisis de segregación. De este modo, la información genética conservada en el ADN, puede describirse como un paisaje cromosómico de distribución espacial de la información genética. Así, determinadas secuencias de ADN y de genes constituyen hitos cromosómicos, de gran aplicación, en estudios evolutivos comparativos entre grupos de especies (sintenia cromosómica), análisis de procesos de especiación, comprensión de las variaciones del tamaño genómico (adición y pérdida de ADN), hasta la identificación de regiones genómicas o secuencias específicas sujetas a manipulación biotecnológica. El empleo de nuevas tecnologías como la microdissección cromosómica permite conocer las secuencias de ADN presentes en un cromosoma o región específica del mismo y con ellas, construir sondas de ADN de

reconocimiento de segmentos de cromosomas completos. Las sondas de ADN específicas, se usan marcadas con fluorocromos específicos para ser detectados en células y/o localizados espacialmente sobre cromosomas.

Los nuevos métodos de citogenética combinada con análisis filogenéticos son actualmente conocidos como el renacimiento de la citogenética (Pires y Hertweck, 2008). Sin embargo, este renacer no solo se debe a la confluencia de los estudios cromosómicos con los filogenéticos, sino también con otras disciplinas de la biología, por ejemplo, con la citometría de flujo. La geografía del *status* cromosómico, es un enfoque que se vale de la geo-localización, modelos de distribución espacial de poblaciones, biogeografía histórica e historia de los cambios climáticos para elaborar hipótesis evolutivas robustas de grupos de organismos (Zozomova-Lihová et al., 2015; Acosta et al., 2016), que permiten describir espacialmente la distribución de individuos y poblaciones con diferente condición cromosómica. Este abordaje ha demostrado que la variación intraespecífica del nivel de ploidía y la coexistencia de citotipos dentro de una población, son hechos más comunes de lo que se había pensado (Husband et al., 2013; Bonasora et al., 2015; Schedler et al., 2015; Reutemann et al., 2015;) y de gran aplicación en la biología y genética de la conservación.

En este artículo, se ha pretendido que el lector concluya que la citogenética es complementaria a otros abordajes, una herramienta poderosa, versátil y fundamentalmente insustituible.

■ BIBLIOGRAFÍA

Acosta M. C., Moscone E.A, Cocucci A. A. (2016) Using chromoso-

mal data in the phylogenetic and molecular dating framework: karyotype evolution and diversification in *Nierembergia* (Solanaaceae) influenced by historical changes in sea level. *Plant Biology* 18, 514-526.

Adilardi R. S., Ojanguren-Affilastro A. A., Mattoni C. I., Mola L. M. (2015) Male and female meiosis in the mountain scorpion *Zabius fuscus* (Scorpiones, Buthidae): heterochromatin, rDNA and TTAGG telomeric repeats. *Genetica* 143, 393-401.

Asker S. E., Jerling L. (1992) *Apo-mixis in plants*. CRC Press, Boca Raton

Bolzán, A. D. (2012) Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. *Mutagenesis* 27, 1-15.

Bolzán A. D., Bianchi M. S. (2004a) Detection of incomplete chromosome elements and interstitial fragments induced by bleomycin in hamster cells using a telomeric PNA probe. *Mutation Research* 554, 1-8.

Bolzán A. D., Bianchi M. S. (2004b) Analysis of streptonigrin-induced incomplete chromosome elements and interstitial fragments in Chinese hamster cells using a telomeric PNA probe. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 44, 277-282.

Bolzán A. D., Bianchi M. S. (2005) Analysis of streptozotocin-induced incomplete chromosome elements and excess acentric fragments in Chinese hamster cells using a telomeric PNA probe. *Mutation Research* 570, 237-244.

Bolzán A. D., Bianchi M. S. (2006)

- Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. *Mutation Research* 612, 189-214.
- Bolzán A. D., Páez G. L., Bianchi M. S. (2001) FISH analysis of telomeric repeat sequences and their involvement in chromosomal aberrations induced by radiomimetic compounds in hamster cells. *Mutation Research* 479, 187-196.
- Bonasora M., Pozzobon M., Honfi A. I. y Rua G. (2015) *Paspalum schesslii* (Poaceae, Paspaleae), a new species from Mato Grosso (Brazil) with an unusual base chromosome number. *Plant Systematic & Evolution* 301, 2325–2339.
- Cerutti J. C., Moscone E. A., Daviña J. R. (2008) Bando cromosómicos de fluorescencia en *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). *Journal of Basic and Applied Genetics* 19 (suppl.), 111.
- Cerutti J. C., Moscone E. A., Daviña J. R. (2011) Cantidad, distribución y composición de la heterocromatina constitutiva en especies del género *Hippeastrum* Herb. (Amaryllidaceae). *Journal of Basic and Applied Genetics* 17 (suppl.), pp 120.
- Darlington C. D. (1937). *Recent Advances in Cytology*. 2ª Ed. Churchill, Londres.
- Darlington, C. D. (1948) La evolución de los sistemas genéticos. Espasa-Calpe Argentina S.A. .
- Daviña, J. R. (1999) Bando cromosómico con cromomicina y Ag-NOR en *Hippeastrum iguanum* (Rav.) T. R. Dudley & M. Williams (Amaryllidaceae). I Simposio Latino-Americano de Citogenética e Evolucao Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco. Recife – Brasil.
- Daviña J. R. (2001) Estudios Citogenéticos en Algunos Géneros Argentinos de Amaryllidaceae. *Tesis Doctoral*, Universidad Nacional de Córdoba, 1- 184.
- Daviña J. R., Fernández A. (1989) Karyotype and Meiotic Behaviour in *Zephyranthes* (Amaryllidaceae) from South America. *Cytologia* 54, 269-274.
- Daviña J. R., Fernández A. (1996) Bando cromosómico con Cromomicina, Hoechst (33258) y Ag-NOR en *Zephyranthes seibertii* (Amaryllidaceae). *Noticiero de Biología* 4, 182.
- Daviña J. R., Grabile M., Cerutti J. C., Hojsgaard D. H., Almada R. D., Insaurralde I. S., Honfi A. I. (2009) Chromosome studies in Orchidaceae from Argentina. *Genetics and Molecular Biology*, 32, 811-821.
- Daviña J. R., Honfi A. I. (2011) La Citogenética Vegetal en Misiones. *Journal of Basic & Applied Genetics* 22. 1-5. Argentina.
- Daviña J. R., Honfi A. I. (2012) Tipo y distribución de la heterocromatina en dos especies del género *Zephyranthes* (Amaryllidaceae). *Journal of Basic and Applied Genetics* 23, suppl., pp: 104.
- Daviña J. R, Honfi A. I. (2013). Citogenómica y polimorfismo en *Habranthus chacoensis* (Amaryllidaceae). *Journal of Basic & Applied Genetics*, 24, suppl., pp: 82.
- Dematteis M., Daviña J. R. (1999) Chromosome studies on some orchids from South America. *Sebyana* 20, 235-238.
- Díaz Flaqué M. C., Bianchi M. S., Bolzán A. D. (2006) A comparative analysis of bleomycin-induced incomplete chromosome elements in two mammalian cell lines using a telomeric PNA probe. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47, 674-681.
- Dos Santos P., Panero J., Palau Nagore V., Stanganelli C., Bezares R. F., Slavutsky I. (2015) Telomere shortening associated with increased genomic complexity in chronic lymphocytic leukemia. *Tumour Biology* 36, 8317-8324.
- Ferreira V., Scaldaferrero M., Grassi E. Szpiniak B. (2007) Nivel de ploidía, estabilidad citológica y fertilidad en cruces de Triticale X Trigopiro (Tricepiros). *Journal of Basic & Applied Genetics* 18, 15-22
- Bernardello G., Stiefkens L., Las Peñas M. L. (2008) Karyotype studies in *Grabowskia* and *Phrodus* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* 275, 265–269.
- Galdeano F., Urbani M. H., Sartor M. E., Honfi A. I., Espinoza F., Quarín C. L. (2016) Relative DNA content in diploid, polyploid, and multiploid species of *Paspalum* (Poaceae) with relation to reproductive mode and taxonomy. *Journal of Plant Research* 129, 697–710.
- Gomes N. M., Shay, J. W., Wright, W. E. (2010) Telomere biology in Metazoa. *FEBS Letters* 584, 3741-3751.
- Grabile M., Daviña J. R., Honfi A. I. (2005) Chromosomes of four species of *Commelina* (Commelinaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 148, 207-218.

- Grabiele M., Cerutti J. C., Hojsgaard D. H., Almada R. D., Honfi A. I., Daviña J. R. (2011 a) Orchidaceae. In: Marhold K. (ed.), IAPT/IOPB Chromosome data 11. Taxon 60, 1220-1223.
- Grabiele M., Cerutti J. C., Hojsgaard D. H., Almada R. D., Daviña J. R., Honfi A. I. (2011b) Orchidaceae. In: Marhold K. (ed.), IAPT/IOPB Chromosome data 12. Taxon 60, E24-27
- Grabiele M., Honfi A. I., Daviña J. R. (2012) Cytotaxonomy of *Tripogandra diuretica* and *T. glandulosa* (Commelinaceae) from NE Argentina. Plant Biosystems 145, 309-316.
- Grant V. (1975) Genetics of Flowering Plants. Columbia University Press.
- Grant V. (1989) Especiación Vegetal. Noriega Editores. Editorial LIMUSA 1° Edición.
- Guerra M. (2000) Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. Genetics and Molecular Biology 23, 1029-1041.
- Hojsgaard D.H., Honfi A. I., Rua G. H., Daviña J. R. (2009) Chromosome numbers and ploidy levels of *Paspalum* species from Subtropical South America (Poaceae). Genetic Resources and Crop Evolution 56, 533-545.
- Hojsgaard D. H., Klatt S., Baier R., Carman J. G., Hörandl E. (2014a). Taxonomy and Biogeography of Apomixis in Angiosperms and Associated Biodiversity Characteristics. Critical Reviews in Plant Science 33, 414-427.
- Honfi A. I., Quarín C. L., Valls J. F. M. (1990) Estudios cariológicos en Gramíneas Sudamericanas. Darwiniana 30, 87-94.
- Honfi A. I. (2003) Citoembriología de poliploides impares en el género *Paspalum* L. (Panicoideae: Gramineae). Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Córdoba, 1-205.
- Honfi A.I. (2011) El nivel de ploidía en la biología evolutiva de *Paspalum* L. Journal of Basic and Applied Genetics (Suppl.), 22-23.
- Honfi A. I., Daviña, J. R. (1999) Karyotype of two species of *Lonchocarpus* Kunth (Fabaceae): *L. leucanthus* Burk. and *L. muehlbergianus* Hassler. Phytan International Journal of Experimental Botany 65, 23-26.
- Honfi A. I., J. R. Daviña (2015) Flora De Interés Forrajero y Ornamental De Campo San Juan. En: Bauni V. y Homberg M. A. editores. Reserva Natural Campo San Juan. Capítulo 4. Fundación De Historia Natural Félix De Azara, 53 - 68.
- Honfi A. I., Morrone O., Zuloaga F. O. (2011) Comportamiento meiótico y frecuencia de quiasmas de algunas Paniceae (Poaceae, Panicoideae). Journal of Basic and Applied Genetics (Suppl.) 22, 22-23.
- Hunziker J. H. (1976). Francisco Alberto Sáez y su contribución al desarrollo de la citogenética rioplatense. Mendeliana 1, 69-74.
- Hunziker J. H. (2000). Some historical aspects of plant cytogenetics in Argentina and Uruguay. Genetics and Molecular Biology 23, 917-920.
- Hunziker J. H., Sáez F. A. (1976). Citogenética y Genética Evolutiva Vegetal y Animal en la Argentina. Historia y Bibliografía (1923-1972). Boletín Academia Nacional de Ciencias 51, 284-323.
- Jafri M. A., Ansari S. A., Alqahtani M. H., Shay J. W. (2016) Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. Genome Medicine 8, 69-86.
- Lacadena J. R. (1996) Citogenética. 1ra. Edición. Editorial Complutense S.A., Madrid.
- Lanzone C., Labaroni C., Suárez N., Rodríguez D., Herrera M. L., Bolzán A. D. (2015) Distribution of Telomeric Sequences (TTAGGG) in Rearranged Chromosomes of Phyllotine Rodents (Cricetidae, Sigmodontinae). Cytogenetics and Genome Research 147, 247-252.
- Lin K.W., Yan J. (2008) Endings in the middle: current knowledge of interstitial telomeric sequences. Mutation Research 658, 95-110.
- Lizarralde M., Bolzán A. D., Bianchi M. S. (2003) Karyotypic evolution in south american subterranean rodents *Ctenomys magellanicus* (Rodentia Octodontidae): chromosome rearrangements and (TTAGGG)_n telomeric sequence localization in 2n = 34 and 2n = 36 chromosomal forms. Hereditas 139, 13-17.
- Lizarralde M. S., Bolzán A. D., Poljak S., Pigozzi M. I., Bustos J., Merani M. S. (2005) Chromosomal localization of the telomeric (TTAGGG)_n sequence in four species of Armadillo (Dasypodidae) from Argentina: An approach to explaining karyotype evolution in the Xenarthra. Chromosome Research 13, 777-784.

- Maluszynska J., Heslop-Harrison J. S. (1993) Molecular cytogenetics of the genus *Arabidopsis*: *in situ* localization of rDNA sites, chromosome number and diversity in centromeric heterochromatin. *Annals of Botany* 71, 479-484.
- Martínez A. J. (1985) The chromosomes of Orchids VIII. Spiranthinae and Cranichidinae. *Kew Bulletin* 40, 139-147.
- Martínez P. A., Boeris J. M., Sánchez J., Pastori M. C., Bolzán A. D., Ledesma M. A. (2009) Karyotypic characterization of *Trachemys dorbigni* (Testudines: Emydidae) and *Chelonoidis (Geochelone) donosobarrosi* (Testudines: Testudinidae), two species of Cryptodiran turtles from Argentina. *Genetica* 137, 277-283.
- Mencucci M. V., Vidal Bravo M., Bianchi M.S., Bolzán, A. D. (2012) Streptonigrin induces delayed chromosomal instability involving interstitial telomeric sequences in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research* 747, 46-52.
- Mengual Gómez D. L., Armando R. G., Cerrudo C. S., Ghiringhelli P. D., Gómez D. E. (2016) Telomerase as a cancer target. Development of new molecules. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 16, 2432-2440.
- Meyne J., Ratliff R. L., Moyzis R. K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 86, 7049-7053.
- Meyne J., Baker R.J., Hobart H.H., Hsu T.C., Ryder O.A., Ward O.G., Wiley J.E., Wurster-Hill D.H., Yates T.L., Moyzis R.K. (1990) Distribution of nontelomeric sites of (TTAGGG)_n telomeric sequences in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99, 3-10.
- Mudry M. D., Nieves M., Bolzán A. D. (2007) Chromosomal localization of the telomeric (TTAGGG)_n sequence in eight species of New World Primates (Neotropical Primates, Platyrrhini). *Cytogenetics and Genome Research* 119, 221-224.
- Muller H. J. (1938) The remaking of chromosomes. *The Collecting Net* 13, 181-198.
- Murnane, J. P. (2012) Telomere dysfunction and chromosome instability. *Mutation Research* 730, 28-36.
- Naranjo, C. A., Andrada A. B. (1975) El cariotipo fundamental en el género *Hippeastrum* Herb. (*Amaryllidaceae*). *Darwiniana* 19, 566 - 582.
- Nogler G. A. (1984) Gametophytic apomixis. In: Johri BM (ed). *Embryology of angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin.
- Ortiz J. P. A., Quarín C. L., Pessino S. C., Acuña C. A., Martínez E. J., Espinoza F., Hojsgaard D. H., Sartor M. E., Cáceres M. E. y Pupilli F. (2013) Comparative genomics of apomixis in *Paspalum* (Review). *Annals of Botany* 112, 767-787.
- O'Sullivan R. J., Karlseder, J. (2010) Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nature Review Molecular Cell Biology* 11, 171-181.
- Pampalona J., Soler D., Genescá A., Tusell, L. (2010) Whole chromosome loss is promoted by telomere dysfunction in primary cells. *Genes Chromosomes Cancer* 49, 368-378.
- Panero J., Stella F., Schutz N., Fantl D. B., Slavutsky I. (2015) Differential Expression of Non-Shelterin Genes Associated with High Telomerase Levels and Telomere Shortening in Plasma Cell Disorders. *PLoS One* 10, e0137972.
- Paviolo N. S., Quiroga I. Y., Castrogiovanni D. C., Bianchi M. S., Bolzán, A. D. (2012) Telomere instability is present in the progeny of mammalian cells exposed to bleomycin. *Mutation Research* 734, 5-11.
- Paviolo N. S., Castrogiovanni D. C., Bolzán A. D. (2014) The radiomimetic compound streptonigrin induces persistent telomere dysfunction in mammalian cells. *Mutation Research* 760, 16-23.
- Paviolo N. S., Santiñaque F. F., Castrogiovanni D. C., Folle G. A., Bolzán A. D. (2015) The methylating agent streptozotocin induces persistent telomere dysfunction in mammalian cells. *Mutation Research* 794, 17-24.
- Pires J. C. y K. L. Hertweck (2008) A Renaissance of Cytogenetics: Studies in Polyploidy and Chromosomal Evolution. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 95, 275-281.
- Poggio L., Realini M. F., Fourastié M. F., García A. M., González G. E. (2014) Genome downsizing and karyotype constancy in diploid and polyploid congeners: a model of genome size variation. *AoB PLANTS* 6: plu029; doi:10.1093/aobpla/plu029
- Poon S. S., Martens U. M., Ward R. K., Lansdorp P. M. (1999) Telomere length measurements using

- digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 36, 267-278.
- Quarin C. L. (1992) The nature of apomixis and its origin in panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* 5, 8-15.
- Quiroga I. Y., Paviolo N. S., Bolzán A. D. (2013) Interstitial telomeric sequences are not preferentially involved in the chromosome damage induced by the methylating compound streptozotocin in Chinese hamster cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 54, 147-152.
- Rai R., Chen Y., Lei M., Chang S. (2016) TRF2-RAP1 is required to protect telomeres from engaging in homologous recombination-mediated deletions and fusions. *Nature Communications* 7, 1-13.
- Reutemann A. V., Daviña J. R., Hojsgaard D. H., Martínez E. J., Honfi A. I. (2015) Niveles de ploidía en poblaciones naturales de *Paspalum cromyorrhizon* Trin. ex Döll. (Poaceae). *Journal of Basic and Applied Genetics* 26, (Supp) 115.
- Rodkiewicz B. (1970) Callose in cells walls during megasporogenesis in *Angiosperms*. *Planta* 93, 39-47.
- Ruiz-Herrera A., Nergadze S. G., Santagostino M., Giulotto E. (2008) Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenetics and Genome Research* 122, 219-228.
- Sader M. A., y Honfi A. I. (2007) Los cromosomas de *Paspalum alium* Chase. *Journal of Basic and Applied Genetics* 18 (Supp), 114.
- Sánchez J., Bianchi M. S., Bolzán A. D. (2009) Effect of bleomycin on interstitial telomeric sequences of immortalized Chinese hamster cells. *Mutation Research* 669, 139-146.
- Sánchez J., Bianchi M. S., Bolzán A. D. (2010) Relationship between heterochromatic interstitial telomeric sequences and chromosome damage induced by the radiomimetic compound streptonigrin in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research* 684, 90-97.
- Sánchez J., Alcalde L., Bolzán A. D. (2015) First evidence of chromosomal variation within *Chelonoidis chilensis* (Testudines: Testudinidae). *Herpetology Journal* 25, 83-89.
- Savidan Y. (2000). Apomixis: Genetics and breeding. *Plant Breeding Review* 18, 13-86.
- Shaw M. W. (1970) Human Chromosome Damage by Chemical Agents. *Annual Review of Medicine* 21, 409-432.
- Schedler M., Zilli A. L., Acuña C. A., Honfi A. I., Martínez E. J. (2014). Niveles de ploidía en poblaciones naturales de especies sexuales y apomícticas del género *Paspalum*. *Journal of Basic & Applied Genetics*. 26 (Suppl), 246.
- Schweizer D. (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58, 307-324.
- Schweizer D. (1981) Counterstaining-enhanced chromosome banding. *Human Genetics* 57, 1-14.
- Seijo J. G., Lavia G. I., Fernández A., Krapovickas A., Ducasse D., Moscone E. A. (2004) Physical mapping of the 5S and 18S-25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid Progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 91, 1294-1303.
- Solís Neffa V. G. (2010) Geographic patterns of morphological variation in *Turnera sidoides* subsp. *pinnatifida* (Turneraceae). *Plant Systematics and Evolution* 284, 231-253.
- Solis Neffa V. G., Fernandez A. (2001). Cyto geography of the *Turnera sidoides* L. complex (Turneraceae, Leiocarpaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 134, 189-196.
- Solís Neffa V. G., Faloci M. M., Seijo J. G. (2003) Cyanogenesis variation in the *Turnera sidoides* L. polyploid complex (Turneraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 141, 85-94.
- Solis Neffa V. G., Seijo J. G. (2003). Citogeografía del complejo autopoliploide *Turnera sidoides* L. (Turneraceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 38, 247-248.
- Stebbins G. L. (1970) Chromosome evolution in higher plants. Addison Wesley Publ. CO.
- Steinberg E. R., Cortés-Ortiz L., Nieves M., Bolzán A. D., García-Orduña F., Hermida-Lagunes J., Canales-Espinosa D., Mudry M. D. (2008) The karyotype of *Alouatta pigra* (Primates: Platyrrhini): mitotic and meiotic analyses. *Cytogenetics and Genome Research* 122, 103-109.
- Tamayo M., Mosquera A., Rego I., Blanco F. J., Gosálvez J., Fer-

nández, J. L. (2011) Decreased length of telomeric DNA sequences and increased numerical chromosome aberrations in human osteoarthritic chondrocytes. *Mutation Research* 708, 50-58.

Vidal Bravo M., Bianchi M. S., Bolzán A. D. (2012) Bleomycin induces delayed instability of interstitial telomeric sequences in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research* 731, 133-139.

Weissmann A. (1887b) On the significance of the polar globules. *Nature*, 36.

Zilli A. L., Hojsgaard D. H., Brugnoli E. A., Acuña C. A., Honfi A. I.; Urbani M. H., Quarín C. L. Martínez E. J. (2014) Genetic relationship among *Paspalum* species of the subgenus *Anachyris*: taxonomic and evolutionary implications. *Flora* 209, 604 - 612.

Zozomova-Lihova J., I. Mlanaova-

Krasna, P. Vit, T. Urfus, D. Senko, M. Svitok, M. Kempa, K. Marhold (2015) Cytotype distribution patterns, ecological differentiation and genetic structure in a diploid-tetraploid contact zone of *Cardamine amara*. *American Journal of Botany* 102, 1380-1395.

Zuloaga F. O., Morrone O. y Rodríguez D. (1999) Análisis de la biodiversidad de las plantas vasculares de la Argentina. *Kurtziana* 27, 17-167.



Para encontrar todas las soluciones en instrumental, no hace falta investigar.

 **microlat**
instrumental científico