

La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales

Molecular cytogenetics in plant genome analysis

Juan Carlos Herrera¹

Resumen: La citogenética es la disciplina que estudia las implicaciones genéticas de la estructura y el comportamiento de los cromosomas. Durante las últimas dos décadas los estudios citogenéticos avanzaron gracias a la información generada por métodos clásicos, los cuales permitieron establecer los primeros modelos citogenéticos en especies como tomate, trigo y arroz. Al final del siglo pasado los estudios citogenéticos mostraron un avance significativo gracias a la implementación de nuevas técnicas destinadas al análisis de cromosomas, tanto mitóticos como meióticos, entre las cuales se destacan el bandeo de cromosomas y la hibridación *in situ* sobre cromosomas. Actualmente, la mayoría de las técnicas de citogenética molecular se basan en la tecnología de la hibridación *in situ* fluorescente o FISH (*fluorescent in situ hybridization*). Esta tecnología abrió la posibilidad de estudiar regiones específicas de la cromatina directamente sobre los cromosomas, gracias a la información derivada de la secuencia misma del ADN, y no solamente por simples características morfológicas. Como consecuencia, la citogenética molecular ha adquirido una importancia cada vez mayor en los diferentes proyectos de mapeo genético que se adelantan actualmente. En la presente revisión se hace una descripción breve de la progresión que han tenido las técnicas de citogenética, desde la llamada 'citogenética clásica' hasta las técnicas actuales de alta resolución. Esta descripción histórica es seguida de varios ejemplos concretos que ilustran la utilización de la FISH, no sólo en el mejoramiento genético de los cultivos, sino también en el estudio estructural y funcional de los genomas vegetales.

Palabras clave: hibridación *in situ*, FISH, cromosomas, mejoramiento genético, mapa citogenético.

Abstract: Cytogenetics would be defined as a discipline concerned with the genetic implications of chromosome structure and behavior. During past twenty years cytogenetics studies were carried out due to the information derived from classical methods based on chromosome deletions and translocations. As a result of such studies, the first cytogenetic models in such species as tomato, wheat, and rice were created. Significant advances in most plant cytogenetic systems have occurred in the last quarter of the 20 century with the introduction of chromosome banding, *in situ* hybridization, and other techniques for the analysis of somatic and meiotic chromosomes. Most of current cytogenetic protocols are based on the fluorescent *in situ* hybridization (FISH) technology. This DNA:DNA *in situ* method had opened a possibility to address chromatin regions of individual chromosomes on the basis of DNA sequence information in addition of mere morphological features. With genome mapping projects underway sequencing chromosomes and genomes, cytogenetic research had become more relevant. In this review, a historical perspective of chromosome research during the last 80 years is presented. It shows the progression of the 'classical cytogenetics' up to current 'molecular cytogenetics' founded on high resolution techniques such as FISH. The diversity of applications is illustrated through some practical examples of valuable current utilization of FISH-based methodologies in plant breeding programs, as well as in structural and functional genomics.

Key words: *in situ* hybridization, FISH, plant breeding, plant chromosomes, cytogenetic map.

Fecha de recepción: 21 de noviembre de 2006
Aceptado para publicación: 06 de junio de 2007

¹ Investigador científico II, Disciplina de Mejoramiento Genético y Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones del Café (CENICAFE), Chinchiná, Caldas. e-mail: juanc.herrera@cafedecolombia.com

Introducción

EL TÉRMINO CITOGENÉTICA define en un sentido amplio aquella disciplina que trata sobre la estructura y el comportamiento de los cromosomas, así como de las implicaciones genéticas derivadas de su estudio (Gill y Friebe, 1998). Los trabajos citogenéticos realizados en los últimos veinte años se han concentrado principalmente en el estudio de la estructura y evolución del genoma de diferentes especies vegetales, tanto silvestres como cultivadas. En estas últimas, la citogenética ha facilitado grandemente el entendimiento de la organización y estructura de los genomas, de ahí la importancia que ha empezado a tener en los proyectos de mapeo genético que se adelantan actualmente en distintas especies.

Los llamados mapas citogenéticos o cromosómicos constituyen una etapa intermedia entre los mapas físicos (basados en el ordenamiento secuencial de grandes fragmentos cromosómicos) y los mapas genéticos (derivados de los análisis genéticos o de ligamiento). La disponibilidad de un mapa citogenético permite posicionar los genes, y los marcadores ligados a éstos, con respecto a los marcadores de tipo estructural propios de regiones cromosómicas específicas (por ejemplo, centrómeros, telómeros, constricciones secundarias). En consecuencia, una información citogenética detallada resulta indispensable para combinar de manera coherente, la información genética disponible con la estructura física de los cromosomas.

Orígenes de la citogenética clásica

La citogenética clásica propiamente dicha nació en los albores del siglo XX con los estudios sobre la estructura y comportamiento de los cromosomas del maíz, los cuales dominaron una buena parte de las ciencias biológicas de la época (Longley, 1927; Randolph, 1941; Roman, 1947). Gracias a estos primeros resultados, hacia 1930 ya se contaba con mapas detallados de los cromosomas paquiténicos del maíz, donde cada cromosoma podía ser diferenciado con base en su tamaño, la posición del centrómero, el largo de sus cromátides y los patrones de coloración de la cromatina. Como resultado de ello, diferentes mapas citogenéticos estuvieron rápidamente a disposición de los genetistas, cada vez más interesados en el estudio detallado del genoma. Dentro de los muchos estudios citogenéticos realizados cabe destacar las contribuciones pioneras de la Dra. Barbara McClintock al conocimiento de la dinámica de los ‘elementos

móviles’ en los cromosomas del maíz (Jones, 2005). Años más tarde, Rick y colaboradores desarrollarían el primer sistema citogenético para el tomate, basados en la información generada por los estudios sobre los cromosomas paquiténicos. Fue justamente este complejo sistema el que sirvió de base al grupo de Tanksley para la clonación del primer gen de resistencia sobre una especie vegetal (Martin *et al.*, 1993).

Luego del descubrimiento en 1953 del código genético por Watson y Crick, la mayor parte de los trabajos científicos en el área de la citogenética se orientaban a la descripción minuciosa de la forma y el número de cromosomas, así como a la caracterización detallada de las mutaciones. El rápido desarrollo de nuevas metodologías de tinción y manipulación de los cromosomas llevó sentar las bases para el gran desarrollo que habría de tener la citogenética en los años venideros. Fue por aquella época que se logró determinar el número exacto de cromosomas del genoma humano (Tijo y Levan, 1956) e identificar las estructuras proteicas responsables del apareamiento cromosómico durante el proceso de división celular (Moses, 1968).

La nueva era de la citogenética molecular

Quince años debieron pasar antes que las llamadas ‘tecnologías del ADN’ hicieran irrupción en el área de la citogenética, dando comienzo a una revolución sin precedentes en el conocimiento de la ultraestructura y el funcionamiento de los cromosomas. Como producto de ello nació la citogenética molecular, una disciplina que podría definirse como la fusión entre la citogenética clásica y la biología molecular. En forma general, agrupa un conjunto de técnicas que aplican diferentes métodos de la biología molecular directamente sobre preparaciones citológicas tales como tejidos, células, cromosomas y fibras de ADN.

El punto de partida de la citogenética molecular remonta a los primeros experimentos de hibridación con sondas de ADN y de ARN marcadas radioactivamente (Jhon *et al.*, 1969; Pardue y Gall, 1969). A pesar de la importancia de estos resultados, por aquella época la técnica *per se* no tendría el auge esperado por dos razones fundamentales: a) la existencia de limitaciones técnicas relacionadas con la detección autoradiográfica de las sondas radioactivas, y b) la ausencia de protocolos eficientes para la clonación de secuencias de interés. No obstante, una observación derivada de estos traba-

jos daría comienzo a una importante innovación en el campo de la citogenética. En efecto, durante sus experimentos, Pardue y Gall (1969) notaron una alteración en las propiedades de coloración de los cromosomas cuando éstos eran sometidos a condiciones de denaturación específica (por ejemplo, lisis alcalina y alta temperatura). Este hecho sugería que era posible obtener bandas específicas que *a priori* permitirían diferenciar individualmente los cromosomas. Un año después los trabajos de Caspersson *et al.* (1970) mostraron que algunos agentes fluorescentes como la quinacrina, permiten obtener patrones de bandas específicos cuando se fijaban sobre regiones cromosómicas ricas en guanina. Este tipo de bandeo diferencial, conocido como ‘bandas Q’, sirvió de base para la identificación completa de los cromosomas en humanos y más tarde en otras especies (Comings, 1978; Schweizer, 1980; Vosa, 1985).

La verdadera revolución en el campo de la citogenética se dio en los últimos 15 años, particularmente en el área humana y animal. Las innovaciones técnicas en la microscopía confocal y epifluorescente, así como el desarrollo de componentes ópticos de excelentes características (lentes, filtros, captores), mejoraron de manera decisiva el desempeño de los clásicos microscopios de luz transmitida. A estos cambios se sumó la implementación progresiva de una amplia gama de métodos de hibridación con sondas fluorescentes, basadas en la utilización de una gran variedad de fluorocromos que abarcaban prácticamente toda la gama del espectro luminoso, desde el infrarrojo hasta el ultravioleta. En fin, el desarrollo de métodos rápidos y precisos para la marcación y detección de sondas, así como la utilización de *software* especializado para el tratamiento de imágenes, darían un gran empuje a las técnicas modernas basadas en la llamada hibridación *in situ* fluorescente o FISH (por *fluorescent in situ hybridization*) utilizadas en la investigación médica y biológica actual.

La hibridación in situ de alta resolución

A diferencia de las técnicas citogenéticas convencionales, las técnicas FISH se basan en reacciones moleculares específicas entre el ADN cromosómico y otra secuencia cualquiera denominada ‘sonda’. El principio de la técnica FISH sobre cromosomas consiste en la hibridación de sondas de ADN previamente marcadas con un fluorocromo específico directamente sobre el ADN cromosómico, aprovechando la homología existente entre éstas. Las sondas utilizadas pueden ser de dos tipos:

secuencias repetitivas o secuencias únicas o de ‘copia simple’. Para la detección de tales sondas los preparados cromosómicos se exponen a la luz ultravioleta, lo cual provoca la excitación de los electrones de la molécula fluorescente. Esta excitación se caracteriza por una emisión de rayos cuya longitud de onda varía según el tipo de fluorocromo empleado. Las principales ventajas de esta técnica radica en su seguridad, su rapidez y, sobre todo, en su potencial para la identificación simultánea de diferentes sondas (Jiang y Gill, 1994; Heslop-Harrison y Schwarzscher, 1996; Lichter, 1997).

Los primeros estudios de FISH en diferentes especies vegetales se orientaron principalmente al mapeo de secuencias repetitivas y de familias de multigenes (Jiang *et al.*, 1996). Sin embargo, el rápido progreso de la técnica ha permitido optimizar cada una de las diferentes etapas, trayendo como consecuencia una mejora sustancial tanto en la sensibilidad como en el poder de resolución espacial, hasta el punto de permitir la detección de secuencias únicas (Herrick y Bensimon, 1999). El término ‘sensibilidad’ designa el tamaño mínimo de una secuencia de ADN que puede ser detectada de manera no ambigua bajo el microscopio. Por su parte, ‘la resolución espacial’ puede definirse como la distancia física mínima a la que dos secuencias adyacentes (en el ADN cromosómico) pueden ser identificadas bajo un microscopio de fluorescencia (De Jong *et al.*, 1999).

Los trabajos recientes que han usado la microscopía electrónica de barrido han permitido tener una visión más realista de la estructura de los cromosomas mitóticos de las plantas. De acuerdo con el modelo propuesto por Wanner *et al.* (2005), los cromosomas se estructuran en diferentes niveles de condensación, que van desde la fibra desnuda de ADN de apenas dos nanómetros (nm) hasta los llamados cromómeros, que corresponden a estructuras en bucle de 200 a 300 nanómetros (figura 1). Es el ‘super-enrollamiento’ de estos cromómeros lo que va a formar los brazos (o cromátidas) de los cromosomas. En la práctica, bajo condiciones óptimas de hibridación y de detección, la sensibilidad de la técnica FISH depende en buena parte de la accesibilidad de la sonda a la región homóloga sobre el ADN, la cual está determinada a su vez, por el grado de condensación del ADN cromosómico. En otras palabras, entre menos condensados se encuentren los cromosomas, la molécula de ADN estará menos enrollada y, en consecuencia, la accesibilidad de las sondas al ADN cromosómico será mejor (Van de Rijke *et al.*, 2000). El grado de condensación de la cromatina varía

de forma importante, no solamente entre las diferentes fases de la división celular (figura 2), sino también entre los diferentes tipos de configuración adoptada por el ADN cromosómico (tabla 1).

El primer material utilizado para realizar análisis FISH fueron los cromosomas mitóticos en metafase. Este tipo de cromosomas se caracterizan por mantener su morfología básica, lo cual permite inferir de manera general la ubicación de las sondas en el genoma. Sin embargo, la elevada condensación de la cromatina que caracteriza la metafase reduce grandemente tanto la resolución como la sensibilidad obtenidas al utilizar este tipo de cromosomas. Ante tal limitante, la fijación de cromosomas mitóticos en estadios más tempranos (como la interfase) es una alternativa interesante dado el menor grado de condensación que presentan. Si bien la resolución mejora sensiblemente, la pérdida de la estructura cromosómica, a causa de la descondensación de la cromatina, impide la localización precisa de la sonda respecto al cromosoma (De Jong *et al.*, 1999). La utilización de cromosomas meióticos, y más exactamente en fase de paquiteno, ofrece dos ventajas importantes con respecto a los cromosomas mitóticos: a) son naturalmente menos condensados y, por tanto, de mayor longitud (hasta 40 veces más largos que los cromosomas mitóticos),

lo cual mejora sensiblemente la resolución obtenida; y además b) muestran una diferenciación clara entre las regiones de eucromatina y heterocromatina que facilita la identificación de regiones específicas dentro de cromosomas individuales (Lavania, 2001; Cheng *et al.*, 2002). A pesar de esto, la obtención de cromosomas paquiténicos sigue siendo difícil y tediosa, particularmente en lo que respecta a la obtención de los tejidos florales (por ejemplo, las anteras) y a la interpretación correcta de las diferentes fases del ciclo meiótico entre especies.

Aunque el poder de resolución obtenido con los cromosomas paquiténicos es elevado (entre 10^5 y 10^6 bases, según el tipo de cromatina), el mayor progreso en la detección de secuencias mediante la FISH se obtiene cuando se usan fibras desnudas de ADN, método conocido como 'fiber-FISH' (De Jong *et al.*, 1999). Este método supone el aislamiento de los núcleos y la posterior liberación de las fibras de ADN, previa degradación de la matriz nuclear. Recientemente, Valàrik *et al.* (2004) propusieron un método alternativo que se fundamenta en la preparación de cromosomas 'super-extendidos'. Sin embargo, aunque ésta técnica ofrece elevados niveles de resolución, la necesidad de tener que aislar cromosomas individuales constituye una limitación mayor para una aplicación generalizada.

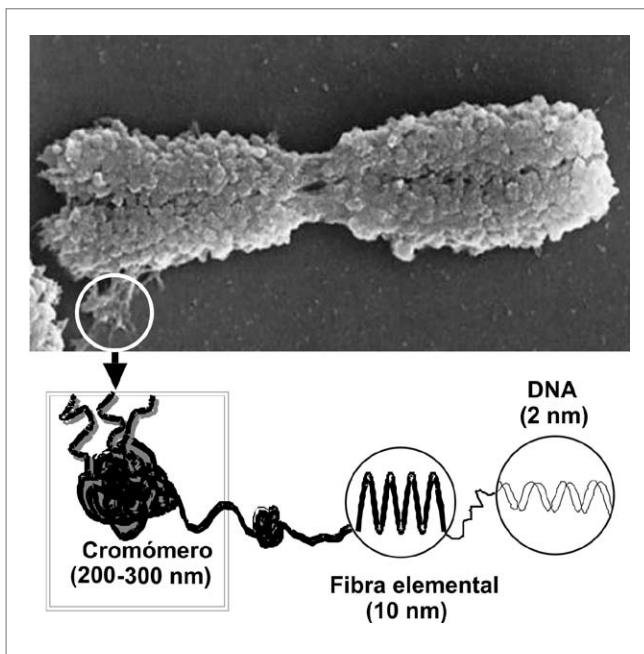


Figura 1. Esquema de los diferentes niveles de condensación de la cromatina según el modelo de matriz dinámica (modificado de Wanner *et al.*, 2005).

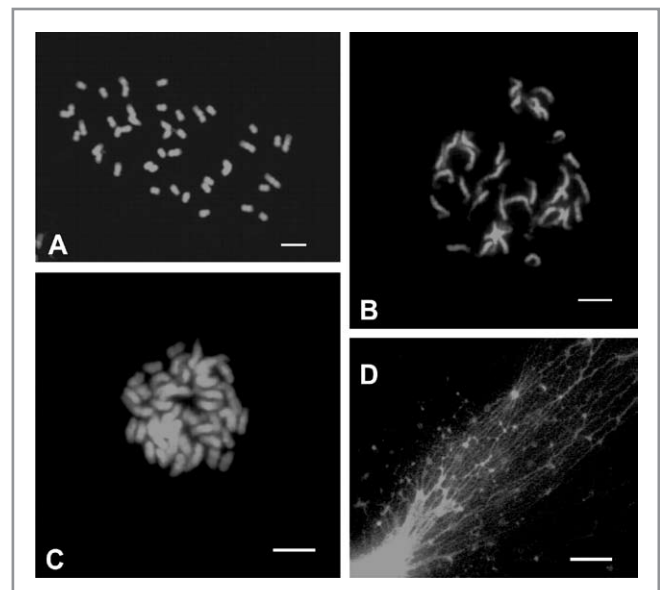


Figura 2. Microfotografías de cromosomas de café (*Coffea arabica*): a, b y c) diferentes fases de condensación de la cromatina durante el ciclo mitótico; d) preparación de fibras de cromatina extendidas a partir de núcleos aislados de células somáticas de café. Línea blanca = 5 µm.

Tabla 1. Resolución y sensibilidad estimadas para la técnica FISH según las diferentes configuraciones del ADN cromosómico (modificado de Valàrik *et al.*, 2004).

Configuración del ADN cromosómico	Resolución espacial	Sensibilidad	Características
Cromosomas mitóticos en metafase	5-10 Mb	10 Kb	Baja sensibilidad y resolución espaciales. La cromatina se encuentra altamente condensada. Los cromosomas conservan sus características morfológicas.
Cromosomas en interfase y/o profase temprana	100 Kb	10 Kb	Buena sensibilidad y resolución espaciales debido a una baja condensación de la cromatina nuclear. Cromosomas aprisionados en el núcleo sin una separación clara. Identificación morfológica casi imposible.
Cromosomas meióticos en paquiteno	60 a 120 Kb (en eucromatina) 0,14 a 1,2 Mb (en heterocromatina)	10 Kb	Alta sensibilidad y resolución espacial. Cromosomas fuertemente decondensados. Características morfológicas reconocibles. Preparación laboriosa.
Cromosomas mitóticos super-extendidos	69 Kb	1-2 Kb	Alta sensibilidad y resolución espaciales. Cromosomas metafásicos estirados linealmente. Pérdida completa de la morfología cromosómica.
Fibras de ADN	1-5 Kb	1 Kb	Óptima sensibilidad y resolución espaciales. Las fibras desnudas de ADN posibilitan la estimación de las distancias físicas mediante co-localización de marcadores adyacentes.

1 Kb = 10^3 ; 1 Mb = 10^6 .

Algunas aplicaciones de la FISH en el estudio de los genomas vegetales

La adaptación de protocolos de FISH en un número cada vez más creciente de especies vegetales ha abierto nuevas posibilidades para el estudio de los genomas vegetales permitiendo, entre otras cosas, los desarrollos siguientes: a) identificar cromosomas específicos, b) estudiar el origen y la estructura de los genomas híbridos, c) comparar regiones genómicas homologas, d) estudiar el comportamiento cromosómico, y e) localizar secuencias específicas de ADN (como por ejemplo, transposones y otros fragmentos cromosómicos). A continuación se presentan ejemplos de algunas de estas aplicaciones.

Identificación de cromosomas. La FISH, combinada con otras técnicas como el bandeo de cromosomas, permite en algunos casos generar nuevos patrones de polimorfismo útiles en la identificación y caracterización de cromosomas (cariotipaje). Un ejemplo de esto es el trabajo de Schrader *et al.* (1997) en el girasol (*Helianthus annuus*); estos autores combinaron la técnica de bandeo con Giemsa con la detección de genes específicos mediante la FISH con el fin de diferenciar cada uno de los cromosomas de ésta especie. En forma similar, Koo *et al.* (2004) utilizaron la hibridación *in situ* para caracterizar los cromosomas de una especie cultivada de colza (*Brassica rapa*). Combinando los patrones heterocromáticos producidos por la coloración fluorescente con DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindol) y la presencia de

secuencias repetitivas específicas, lograron construir un mapa citogenético completo. De otro lado, Andras *et al.* (2000) fueron capaces de obtener patrones diferenciales en cromosomas de diferentes especies vegetales, mediante la combinación de dos fluorocromos: el yoduro de propidio y el DAPI. En la figura 3 (a, b y c) se ilustran algunos ejemplos de la utilización de la FISH para la localización de secuencias repetitivas con el fin de diferenciar cromosomas de arroz, pino y maíz.

Análisis del origen y estructura de genomas. La hibridación genómica *in situ* (GISH, por *genomic in situ hybridization*) es una modificación de la FISH que permite colorear diferencialmente los cromosomas de distintos ancestros (en el caso de una especie) o de genomas parentales (en el caso de un híbrido). Esta técnica utiliza el ADN genómico total de uno de los ancestros (o especies parentales) como sonda, la cual se hibrida sobre los cromosomas metafásicos del individuo estudiado (ya sea una especie o un híbrido). Gracias a esta técnica ha sido posible clarificar el origen del genoma de algunas especies de interés, la mayoría de tipo alopoliploide como el tabaco (Kenton *et al.*, 1993), el trigo (Mukai *et al.*, 1993; Jiang y Gill, 1994), la avena (Jellen *et al.*, 1994), el banano (D'Hont *et al.*, 2000), el café (Lashermes *et al.*, 1999), el maíz (Gonzales *et al.*, 2004), o la planta modelo, *Arabidopsis* (Ali *et al.*, 2004). La figura 3 (d y e) muestran la utilización de la técnica GISH para diferenciar el origen de los cromosomas en un híbrido hexaploide de trigo y en un híbrido intergenérico entre *Lolium* × *Festuca*.

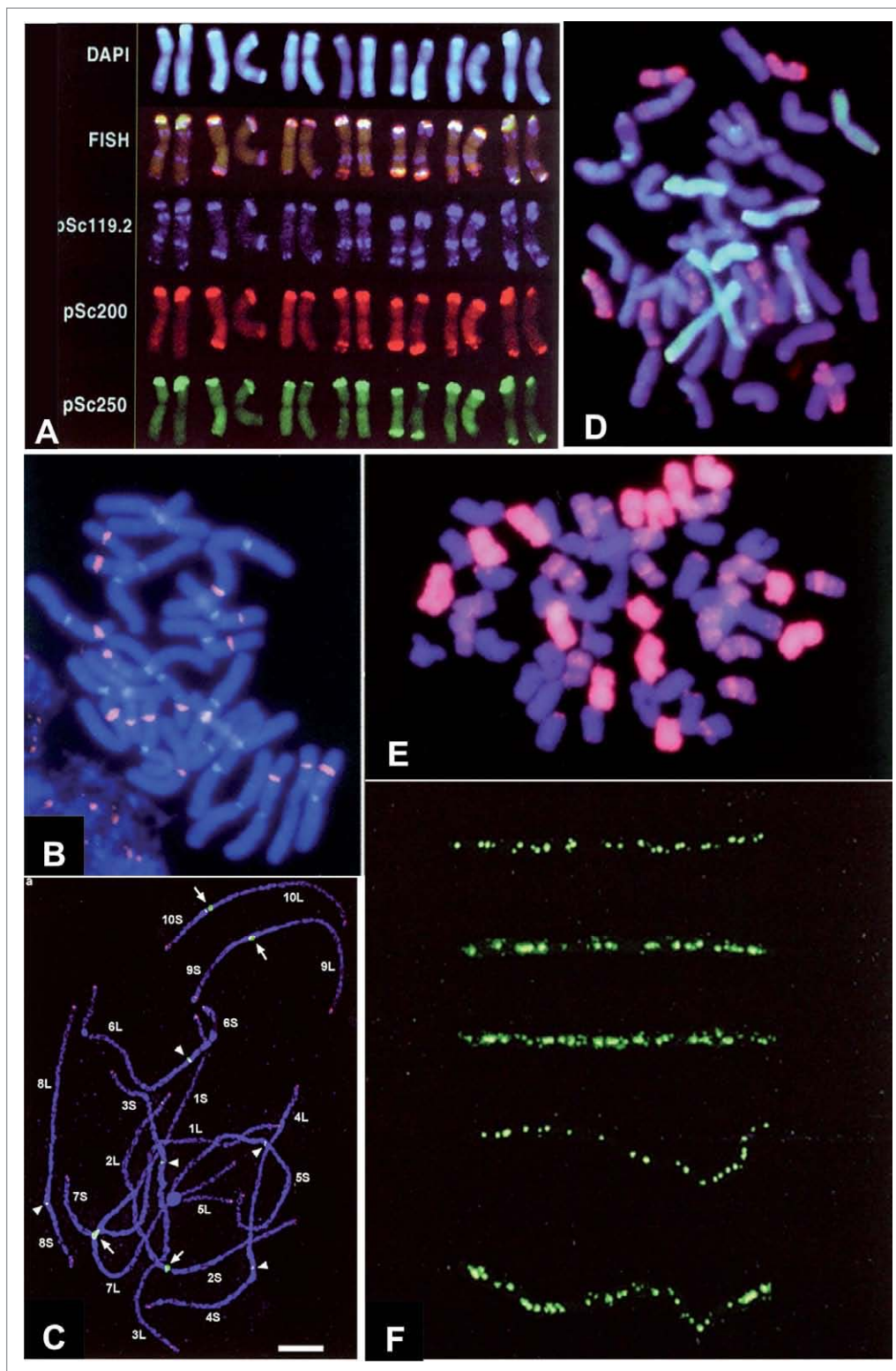


Figura 3. Algunos ejemplos de las aplicaciones de la técnica FISH en el estudio de los genomas vegetales: a) localización de sondas de ADN repetitivo (*pSc119.2*; *pSc200* y *pSc250*) sobre cromosomas metafásicos de arroz; b) localización de secuencias de ADN ribosomal sobre cromosomas metafásicos de pino, *Pinus elliottii*; c) ubicación de secuencias teloméricas y centroméricas sobre cromosomas paquítenicos de maíz; d y e) Discriminación del origen parental de los cromosomas en dos híbridos inter-específicos diferentes mediante GISH; f) fibras extendidas de ADN del arroz (tomado de: Schwarzacher y Heslop-Harrison, 2000; Puertas y Naranjo, 2005).

La GISH también ha sido utilizada con éxito para el análisis de la introgresión en híbridos interespecíficos e intergenéricos, aprovechando la diferencia estructural entre genomas y, particularmente, la presencia de secuencias genoma-específicas (para revisión ver Ananthawat-Jonsson, 2001). La organización nuclear y el comportamiento de los cromosomas han sido también objeto de intensos estudios, no sólo sobre híbridos F₁ (Ananthawat-Jonsson *et al.*, 1993; Poggio *et al.*, 1999) sino también, sobre genotipos avanzados (Schwarzacher *et al.*, 1992; Hou y Peffley, 2000; Ji *et al.*, 2004). La GISH se ha revelado igualmente eficiente para localizar regiones cromosómicas portadoras de genes de resistencia (Tang *et al.*, 1997).

Estudios comparativos entre genomas. La FISH ha sido empleada para el análisis comparativo entre genomas gracias a la técnica conocida como hibridización genómica comparativa o CGH (por *comparative genome hybridization*). Esta técnica, propuesta por Zoller y colaboradores (2001), se basa en la utilización del ADN genómico de una especie patrón (por ejemplo, *Arabidopsis*) que se usa como sonda para hibridarlo sobre los cromosomas de otra especie. Esta hibridación cruzada genera una serie de bandas sobre los cromosomas de la especie estudiada, las cuales corresponden a regiones genómicas conservadas (por lo general, secuencias repetitivas) entre las dos especies.

La ventaja principal de la CGH es que permite analizar el cariotipo de una especie dada con un enfoque molecular, sin necesidad de utilizar secuencias específicas que son difíciles de obtener. La utilización de *Arabidopsis* como especie patrón tiene la ventaja del acceso a la información genética completa, gracias a que todo su genoma ya ha sido enteramente secuenciado. Una modificación de la CGH es el mapeo comparativo *in situ* o ISCM (por *in situ comparative mapping*) el cual permite la co-localización de secuencias particularmente conservadas entre dos genomas. Este tipo de análisis ha sido utilizado para el estudio de la colinearidad entre genomas de diferentes especies, y en particular, de la estructura de los cromosomas homeólogos (Cabrera *et al.*, 2002).

Mapeamiento físico de secuencias de ADN. Dado que los extendidos de fibras de ADN dejan al descubierto la posición linear de las secuencias a lo largo de un fragmento cromosómico, la hibridación *in situ* sobre fibras de ADN o fiber-FISH permite localizar y ordenar secuencias específicas de interés (figura 3, f). De esta forma es posible obtener una imagen detallada

e integral de la secuencia y de su colinearidad con los marcadores asociados a dicha región. Además, permite calcular la distancia física que las separa. El desarrollo de la técnica de fiber-FISH ha sido una herramienta decisiva para el mapeo de regiones asociadas con diferentes enfermedades en el genoma humano (Herrick y Bensimon, 1999). Si bien la adaptación de esta técnica para el estudio del genoma de las plantas se encuentra actualmente restringido a unas pocas especies, los resultados obtenidos son prometedores.

La localización de genes presentes en regiones teloméricas o centroméricas es de particular interés para los estudios de mapeo genético en plantas. Sin embargo, el estudio genético de estas secuencias es generalmente una tarea difícil por la presencia de regiones ricas en heterocromatina, las cuales perturban la recombinación meiótica. Ante las limitaciones del análisis genético, la técnica FISH ofrece una alternativa rápida y precisa para el estudio de este tipo de secuencias. La utilidad de la FISH sobre fibras de ADN para la localización de sondas de pequeña longitud (hasta 40 kilobases, kb) fue demostrada por primera vez en el arroz (Jiang *et al.*, 1995).

El trabajo realizado por Zhong *et al.* (1999) es un ejemplo práctico de la utilización de la FISH en fibras de ADN para el estudio de genes de interés. Con base en la información genética disponible, los autores lograron ubicar físicamente los genes *Mi* y *ApsI* presentes en la región centromérica del cromosoma 6 del tomate, particularmente rica en secuencias repetitivas. Gracias a la hibridación con sondas portadoras de secuencias ligadas a tales genes se logró establecer de manera precisa la distancia física entre estos dos genes.

Otros estudios permitieron confirmar la importancia de esta técnica como una herramienta complementaria para la generación, y posterior verificación, de mapas físicos en especies como arroz y *Arabidopsis* (Zhang y Wing, 1997; Jackson *et al.*, 1998). La *fiber-FISH* ha sido utilizada igualmente para el mapeo de fragmentos de ADN-T transferidos por transgénesis en plantas de papa (Wolters *et al.*, 1998) y en la localización física de diferentes fragmentos cromosómicos estrechamente asociados con genes de resistencia (Xu *et al.*, 2001).

Limitaciones de la técnica FISH

Como toda nueva tecnología, las técnicas basadas en la hibridación *in situ* traen consigo algunas limitacio-

nes, las cuales deben tenerse en cuenta al momento de considerar su utilización. Algunos de los problemas más recurrentes en los experimentos de FISH en plantas tienen que ver con la sensibilidad de detección (determinada principalmente por el tamaño de las secuencias usadas como sonda), y con la especificidad de las sondas (dependiente de la homología genética entre genomas). Estos problemas parecen explicarse por las diferencias existentes respecto del tipo de secuencias (únicas o repetitivas) y de su distribución (localizada o generalizada) a lo largo de los genomas, tanto animales como vegetales.

Contrariamente a lo que se observa en los cromosomas animales, los cromosomas de las plantas poseen un ADN con una proporción muy importante de secuencias repetitivas que se caracterizan por un equilibrio entre los nucleótidos adenina (A) y timina (T) respecto de la guanina (G) y la citosina (C), es decir, en la relación AT:GC. Tal equilibrio posiblemente explica la extensa homogenización que han sufrido los cromosomas en los genomas vegetales como resultado de una frecuencia elevada de eventos de transposición y/o conversión (Schwarzacher *et al.*, 1997). En el caso de algunas especies aloploiploides (derivadas de un cruzamiento entre dos especies ancestrales) así como de ciertos híbridos interespecíficos, el uso de la FISH para discriminar genomas parentales no siempre resulta eficaz; ello por cuanto, si las secuencias repetitivas presentes en el ADN de cada uno de los padres son muy parecidas, o si tales secuencias parentales han sufrido una extensa homogeneización en el genoma del híbrido, la discriminación del origen de los cromosomas se hace muy difícil, y en algunos casos, imposible (Schubert *et al.*, 2001). Finalmente, otro aspecto a tener en cuenta cuando se utiliza la FISH es la eventual variación en la respuesta con el tipo de tejido analizado (Murata *et al.*, 1997). Por tanto, antes de proceder a una utilización extensiva de la FISH en un programa de mapeo físico, podría ser recomendable analizar la respuesta de diferentes tejidos a la hibridación con una prueba específica.

Conclusiones y perspectivas

Gracias al avance vertiginoso de la citogenética molecular de alta resolución, hoy se dispone de un gran arsenal de herramientas destinadas al estudio estructural y funcional de los genomas. El constante adelanto en la tecnología de los equipos de microscopía,

así como el desarrollo de métodos de marcación y detección cada vez más sensibles, hacen presagiar un futuro promisorio para las técnicas de hibridación *in situ* sobre ADN en los campos de la genómica y la post-genómica.

Dentro de las nuevas técnicas que se están aplicando para la detección de secuencias en plantas, aquella conocida como PRINS (por *primed in situ labeling*) ofrece una elevada sensibilidad de detección respecto de la FISH convencional (Kubaláková *et al.*, 2001). Esta técnica se basa en la hibridación de sondas no marcadas sobre el ADN cromosómico, seguida de una amplificación enzimática vía PCR, en presencia de nucleótidos marcados con fluorescencia. De otro lado, la disponibilidad actual de una amplia gama de fluorocromos, permite la coloración simultánea de diferentes cromosomas en un solo experimento de hibridación. Si bien esta técnica, llamada mcGISH (por *multicolor GISH*), ha sido ampliamente utilizada en el análisis del genoma humano y otras especies de mamíferos (Langer *et al.*, 2004), su aplicación en plantas es aún limitada (Lysak *et al.*, 2003). A estas nuevas metodologías se suma la posibilidad técnica de poder aislar cromosomas enteros o partes de un cromosoma con el fin de obtener librerías específicas de utilidad para el aislamiento de secuencias y genes de interés presentes sobre un cromosoma particular.

La caracterización futura de los genomas animales y vegetales mediante las técnicas de citogenética molecular va, sin duda, más allá de la simple genómica descriptiva. Un ejemplo de ello son algunos trabajos recientes que combinan el uso de técnicas de inmunocitogenética y de citogenética molecular para el estudio de la arquitectura nuclear y de los procesos bioquímicos implicados en la transcripción y la replicación del ADN (Tessadori *et al.*, 2004). La utilización progresiva de todas estas tecnologías en los proyectos de genómica que se desarrollan actualmente en diferentes cultivos, servirá sin duda para mejorar nuestra comprensión sobre la organización y la expresión de los genes, uno de los objetivos fundamentales de cualquier programa de mejoramiento genético.

Agradecimientos

El autor desea expresar sus agradecimientos a M. Rodier y F. Anthony por la lectura y sugerencias aportadas durante la escritura de este documento.

Literatura citada

- Ali, H.B.M., M.A. Lysak e I. Schubert. 2004. Genomic *in situ* hybridization in plants with small genomes is feasible and elucidates the chromosomal parentage in interspecific *Arabidopsis* hybrids. *Genome* 47, 954-960.
- Ananthawat-Jonsson, K. 2001. Molecular cytogenetics of introgressive hybridization in plants. *Meth. Cell. Sci.* 23, 139-148.
- Ananthawat-Jonsson, K., T. Schwarzacher y J.S. Heslop-Harrison. 1993. Behavior of parental genomes in the hybrid *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum*. *J. Hered.* 84, 78-82.
- Andras, S.C., T.P.V. Hartman, J. Alexander, R. McBride, J.A. Marshall, J.B. Power, E.C. Cocking y M.R. Davey. 2000. Combined PI-DAPI staining (CPD) reveals NOR asymmetry and facilitates karyotyping of plant chromosomes. *Chrom. Res.* 8, 387-391.
- Cabrera, A., A. Martín y F. Barro. 2002. *In-situ* comparative mapping (ISCM) of Glu-1 loci in *Triticum* and *Hordeum*. *Chrom. Res.* 10, 49-54.
- Caspersson, T., L. Zech, C. Johansson y E.J. Modest. 1970. Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma* 30, 215-227.
- Cheng, Z., C.R. Buell, R.A. Wing, R.A. y J. Jiang. 2002. Resolution of fluorescence *in-situ* hybridization mapping on rice mitotic prometaphase chromosomes, meiotic pachytene chromosomes and extended DNA fibers. *Chrom. Res.* 10, 379-387.
- Comings, D.E. 1978. Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *Annu. Rev. Genet.* 12, 25-46.
- De Jong, J.H., P.F. Fransz y P. Zabel. 1999. High resolution FISH in plants - techniques and applications. *Trends Plant. Sci.* 4, 258-263.
- D'Hont, A., A. Paget-Goy, J. Escoute y F. Carreel. 2000. The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 100, 177-183.
- Gill, B.S. y B. Friebe. 1998. Plant cytogenetics at the dawn of the 21st century. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 109-115.
- Gonzales, G., V. Confalonieri, C. Comas, C.A. Naranjo y L. Poggio. 2004. GISH Genomic *in situ* hybridization reveals cryptic genetic differences between maize and its putative wild progenitor *Zea mays* subsp. *parviglumis*. *Genome* 47, 947-953.
- Herrick, J. y A. Bensimon. 1999. Imaging of single DNA molecule, Applications to high-resolution genomic studies. *Chrom. Res.* 7, 409-423.
- Heslop-Harrison, J.S. y T. Schwarzacher. 1996. Genomic southern and *in situ* hybridization for plant genome analysis. Capítulo 10. pp.163-179. En: *Methods of genome analysis in plants*. Jauhar, P.P. (ed). CRC Press, USA.
- Hou, A. y E.B. Peffley. 2000. Recombinant chromosomes of advanced backcross plants between *Allium cepa* L. and *A. fistulosum* L. revealed by *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 100, 1190-1196.
- Jackson, S.A., M.L. Wang, H.M. Goodman y J. Jiang. 1998. Application of fiber-FISH in physical mapping of *Arabidopsis thaliana*. *Genome* 41, 566-572.
- Jellen, E.N., B.S. Gill y T.S. Cox. 1994. Genomic *in situ* hybridization differentiates between A/D- and C- genome chromatin and detects intergenomic translocations in polyploid oat species (genus *Avena*). *Genome* 37, 613-618.
- Jhon, H.L., M.L. Birnstiel y K.W. Jones. 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223, 912-913.
- Ji, Y., R. Pertuzé y R.T. Chetelat. 2004. Genome differentiation by GISH in interspecific and intergeneric hybrids of tomato and related nightshades. *Chrom. Res.* 12, 107-116.
- Jiang, J. y B.S. Gill. 1994. Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping, the first 10 years. *Genome* 37, 717-725.
- Jiang, J., B. Gill, G.L. Wang, P.C. Ronald y D.C. Ward. 1995. Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4487-4491.
- Jiang, J., S.D.H. Hulbert, B.S. Gill y D.C. Ward. 1996. Interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping, a physical mapping strategy for plant species with large and complex genomes. *Mol. Gen. Genet.* 252, 497-502.
- Jones, R.N. 2005. McClintock's controlling elements, the full story. *Cytogenet. Genome Res.* 109, 90-103.
- Kenton, A., A.S. Parokonny, Y.Y. Gleba y M.D. Bennett. 1993. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *Mol. Gen. Genet.* 240, 159-169.
- Koo, D.H., P. Plaha, Y.P. Lim, Y. Hur, y J.W. Bang. 2004. A high-resolution karyotype of *Brassica rapa* ssp. *Pekinensis* revealed by pachytene analysis and multicolor fluorescence *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 109, 1346-1352.
- Kubaláková, M., J. Vrána, J. Ciháliková, M.A. Lysák y J. Dolezel. 2001. Localization of DNA sequences on plant chromosomes using PRINS and C-PRINS. *Meth. Cell. Sci.* 23, 71-82.
- Langer, S., J. Kraus, I. Jentsch y M.R. Speicher. 2004. Multicolor chromosome painting in diagnostic and research applications. *Chrom. Res.* 12, 15-23.
- Lashermes, P., M.C. Combes, J. Robert, P. Trouslot, A. D'Hont, F. Anthony y A. Charrier. 1999. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Mol. Gen. Genet.* 261, 259-266.
- Lavania, U.C. 2001. High resolution FISH to delineate contiguous and small DNA sequences. *Meth. Cell Sci.* 23, 149-154.
- Lichter, P. 1997. Multicolor FISHing, what's the catch? *Trends Genet.* 13, 475-478.
- Longley, A.E. 1927. Supernumerary chromosomes in *Zea mays*. *J. Agric. Res.* 35, 769-784.
- Lysak, M., A. Pecinka e I. Schubert. 2003. Recent progress in chromosome painting of *Arabidopsis* and related species. *Chrom. Res.* 11, 195-204.
- Martin, G.B., S.H. Brommonschenkel, J. Chunwongse, A. Frary, M.W. Ganal, R. Spivey, T. Wu, E.D. Earle y S.D. Tanksley. 1993. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262, 1432-1436.
- Moses, M.J. 1968. Synaptonemal complex. *Annu. Rev. Genet.* 2, 363-412.
- Mukai, Y., Y. Nakahara y M. Yamamoto. 1993. Simultaneous discrimination of the three genomes in hexaploid wheat by multicolor fluorescence *in situ* hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. *Genome* 36, 489-494.
- Murata, M., J.S. Heslop-Harrison y F. Motoyoshi. 1997. Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multicolor fluorescence *in situ* hybridization with cosmid clones. *Plant J.* 12, 31-37.
- Pardue, M.L. y J.P. Gall. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 64, 600-604.
- Poggio, L., V. Confalonieri, C. Comas, G. Gonzales y C.A. Naranjo. 1999. Genomic affinities of *Zea luxurians*, *Z. diploperennis*, and *Z.*

- perennis*, meiotic behavior of their F₁ hybrids and genomic *in situ* hybridization (GISH). *Genome* 42, 993-1000.
- Puertas, M.J. y T. Naranjo, T. (eds.) 2005. Plant cytogenetics. Karger, Medical and Scientific Publishers, Switzerland. 408 p.
- Randolph, L.F. 1941. Genetic characteristics of the B chromosomes in maize. *Genetics* 26, 608-631.
- Roman, H. 1947. Mitotic non-disjunction in the case of interchanges involving the B-type chromosome in maize. *Genetics* 32, 391-409.
- Schrader, O., R. Ahne, J. Fuchs e I. Schubert. 1997. Karyotype analysis of *Helianthus annuus* using Giemsa banding and fluorescence *in situ* hybridization. *Chrom. Res.* 5, 451-456.
- Schubert, I., P.F. Fransz, J. Fuchs y J.H. de Jong. 2001. Chromosome painting in plants. *Meth. Cell. Sci.* 23, 57-69.
- Schwarzacher, T. y P. Heslop-Harrison (eds.) 2000. Practical *in situ* hybridization. BIOS, Scientific Publishers, UK. 203 p.
- Schwarzacher, T., K. Ananthawat-Jónsson, G.E. Harrison, A.K.M.R. Islam, J.Z. Jia, I.P. King, A.R. Leitch, T.E. Miller, S.M. Reader, W.J. Rogers, M. Shi y J.S. Heslop-Harrison. 1992. Genomic *in situ* hybridization to identify alien chromosomes and chromosome segments in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84, 778-786.
- Schwarzacher, T., M.L. Wang, A.R. Leitch, N. Miller, G. Moore y J.S. Heslop-Harrison. 1997. Flow cytometric analysis of the chromosomes and stability of a wheat cell culture line. *Theor. Appl. Genet.* 94, 91-97.
- Schweizer, D. 1980. Fluorescent chromosome banding in plants: applications, mechanisms and implications for chromosome structure. pp.61-72. En: Davies, D.R. y D.A. Hopwood (eds.). Proceedings of the 4th John Innes symposium: the plant genome. The John Innes Charity, John Innes Institute, London, UK.
- Tang, S., J. Zhuang, Y. Wen, S.A. Ai, H. Li y J. Xu. 1997. Identification of introgressed segments conferring disease resistance in a tetrageneric hybrid of *Triticum*, *Secale*, *Thinopyrum*, and *Avena*. *Genome* 40, 99-103.
- Tessadori, F., R. van Driel y P. Fransz. 2004. Cytogenetics as tool to study gene regulation. *Trends Plant Sci.* 9, 147-153.
- Tijó, J.H. y A. Levan. 1956. The chromosome number of man. *Hereditas* 42, 1-6.
- Valàrik, M., J. Bartos, P. Kovárovà, M.K. Kubalàková, J.H. de Jong y J. Dolezel. 2004. High-resolution FISH on super-stretched flow-sorted plant chromosomes. *Plant J.* 37, 940-950.
- Van de Rijke, F.M., R.J. Florijn, H.J. Tanke y K. Raap. 2000. DNA fiber-FISH staining mechanism. *J. Histochem. Cytochem.* 48, 743-745.
- Vosa, C.G. 1985. Chromosome banding in plants. Capítulo 3. pp. 202-217. En: Sharma A.K. and A. Sharma (eds.). Advances in chromosome and cell genetics. Oxford & IBH Publishing Co., London, UK.
- Wanner, G., E. Schroeder-Reiter y H. Formanek. 2005. 3D analysis of chromosome architecture, advantages and limitations with SM. *Cytogenet. Genome Res.* 109, 70-78.
- Wolters, A-M., L.M. Trindade, E. Jacobsen y R.G.F. Visser. 1998. Fluorescence *in situ* hybridization on extended DNA fibres as a tool to analyze complex T-DNA loci in potato. *Plant J.* 13, 837-847.
- Xu, M., J. Song, Z. Cheng, J. Jiang y S.S. Korban. 2001. A bacterial artificial chromosome (BAC) library of *Malus floribunda* 821 and counting construction for positional cloning of the apple scab resistance gene *Vf*. *Genome* 44, 1104-1113.
- Zhang, H., y R.A. Wing. 1997. Physical mapping of the rice genome with BACs. *Plant Mol. Biol.* 35, 115-127.
- Zhong, X.B., J. Bodeau, P.F. Fransz, V.M. Williamson, A. van Kammen, J.H. de Jong y P. Zabel. 1999. FISH to meiotic pachytene chromosomes of tomato locates the root-knot nematode resistance gene *Mi-1* and the acid phosphatase gene *Aps-1* near the junction of euchromatin and pericentromeric heterochromatin of chromosome arms 6S and 6L, respectively. *Theor. Appl. Genet.* 98, 365-370.
- Zoller, J.F., Y. Yang, R.G. Herrmann y U. Hohmann. 2001. Comparative genomic *in situ* hybridization (cGISH) analysis on plant chromosomes revealed by labeled *Arabidopsis* DNA. *Chrom. Res.* 9, 357-375.