

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Exactas Físicas y
Naturales

Carrera de Ciencias Biológicas

**Estructura, comportamiento y riqueza de ADN
repetitivo en cromosomas B de *Cestrum nocturnum*.**

Tesinista

MONTECHIARI, KEISY AYELEN

Firma

Director

Urdampilleta, Juan Domingo

Firma

IMBIV, CONICET y Universidad Nacional de Córdoba.
Ciudad Universitaria, 5000-Córdoba, Argentina.



Estructura, comportamiento y riqueza de ADN repetitivo en cromosomas B de *Cestrum nocturnum*.

TRIBUNAL EXAMINADOR

Dra. Alejandra, Romanutti Firma

Dr. Franco E., Chiarini Firma

Dra. Laura, Las Peñas Firma

Calificación

Fecha:

Índice

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
GENERALIDADES DE LA FAMILIA SOLANACEAE	9
GENERALIDADES DE LA TRIBU CESTREAE	9
CARACTERÍSTICAS CROMOSÓMICAS DE LA TRIBU CESTREAE	10
EL ADN REPETITIVO	11
GENERALIDADES DE LOS CROMOSOMAS B	13
LOS CROMOSOMAS B EN CESTRUM	15
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	21
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVO ESPECÍFICO	22
MATERIALES Y MÉTODOS	24
1. MATERIAL DE ESTUDIO.	25
2. PREPARACIONES CROMOSÓMICAS.	25
3. BANDEO CROMOSÓMICO.	26
4. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO Y CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS DE ADN REPETITIVO.	26
4.1. Aislamiento de adn satélite (adnsat) con enzimas de restricción.	26
4.2. Amplificación de elementos transponibles (ets) con primer degenerados.	28
5. ANÁLISIS DE SECUENCIAS.	29
6. HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH).	29
7. OBSERVACIÓN.	30
RESULTADOS	32
ANÁLISIS CARIOTÍPICO DE C. NOCTURNUM	33
VARIACIÓN CUANTITATIVA E INESTABILIDAD DE LOS CROMOSOMAS B EN C. NOCTURNUM	36
BANDEO CROMOSÓMICO	41
AISLAMIENTO DE ADN REPETITIVO EN C. NOCTURNUM	44
HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE CON ADN REPETITIVO	50
DISCUSIÓN	52
NÚMERO CROMOSÓMICO Y CARIOTIPO	53
VARIACIÓN DEL NÚMERO DE CROMOSOMAS B	54
BANDEOS CROMOSÓMICOS Y ADN REPETITIVO	56
CONSIDERACIONES FINALES	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXO 1. SECUENCIAS DE ADN REPETITIVO OBTENIDAS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.	75
ANEXO 2. SECUENCIAS DE ADN DE TY1-COPIA.	78
ANEXO 3. SECUENCIAS DE ADN DE TY3-GYPSY.	79
ANEXO 4. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS CON ETs REGISTRADOS EN LAS LAS BASES DE DATOS NCBI Y GYDB. A, TY1-COPIA Y B, TY3-GYPSY.	80

Resumen

El género *Cestrum* pertenece a la familia Solanaceae, desde el punto de vista citogenético es excepcional en la familia, entre sus particularidades podemos mencionar: (1) número básico $x=8$; (2) mayor tamaño cromosómico y genómico de la familia; (3) patrones complejos de la heterocromatina; (4) presencia de cromosomas B con particulares patrones de heterocromatina y distribución de ADNr 45S y 5S; y (5) ausencia de telómeros tipo *Arabidopsis* (TTTAGGG) $_n$ sustituidos por minisatélites ricos en A/T. *Cestrum nocturnum* L. (huele de noche, dama de noche o jazmín nocturno) es una especie cultivada de la flora Argentina. Posee un número diploide de $2n = 16$ y la presencia de cromosomas B (Bs). Los Bs son definidos como componentes adicionales dispensables del genoma que exhiben generalmente una herencia no mendeliana, y no se aparean o recombinan con los cromosomas A durante la meiosis. Difieren del complemento cromosómico de As en tamaño, forma y composición de ADN. La especie *C. nocturnum* presenta $2n = 16 + 1-13$ cromosomas B (Bs). Los cromosomas B son metacéntricos, tienen un menor tamaño que los cromosomas A. Los cromosomas B poseen una gran variabilidad entre y dentro de individuos, denotando la ocurrencia de eventos citológicos que promueven la inestabilidad mitótica y meiótica. Mediante técnicas citogenéticas y moleculares se observó que poseen un patrón de heterocromatina y sitios de ADN ribosómico posiblemente activos. El patrón de heterocromatina indica que los cromosomas B son ricos en ADN repetitivo, probablemente con arreglos ricos en bases AT y GC. Además se detectó que esta heterocromatina es rica en secuencias homologas a regiones codificantes de elementos transponibles de la superfamilia Ty1-Copia y Ty3-Gypsy.

Abstract

The genus *Cestrum* belongs to the family Solanaceae, karyotypically is exceptional on the family, among its particularities we can mention: (1) basic number $x = 8$; (2) greater chromosomal and genomic size of the family; (3) complex heterochromatin patterns; (4) presence of B chromosomes with particular heterochromatin patterns and distribution of 45S and 5S rDNA; and (5) absence of Arabidopsis-type telomeres (TTTAGGG)_n, replaced by minisatellites rich in A / T. *Cestrum nocturnum* L. (Night-blooming Jasmine, Night Jessamine, Night Jasmine, Night-scented Jessamine, Queen of the Night, Lady of the Night) is a cultivated species of the Flora Argentina. It has a diploid number of $2n = 16$ and the presence of chromosomes B (Bs). Bs are defined as additional dispensable components of the genome that generally exhibit a non-Mendelian inheritance, and do not pair or recombine with A chromosomes during meiosis. They differ from the chromosomal complement of As, in size, shape and DNA composition. The species presents $2n = 16 + 1-13$ B chromosomes (Bs). The B chromosomes are metacentric, they have a smaller size than A chromosomes. The B chromosomes possess a great variability between and within individuals, denoting the occurrence of cytological events that promote mitotic and meiotic instability. Using cytogenetic and molecular techniques, it was observed that they possess a heterochromatin pattern and possibly active ribosomal DNA sites. The heterochromatin pattern indicates that B chromosomes are rich in repetitive DNA, probably with rich regions in AT and GC bases. In addition, it was detected that this heterochromatin is rich in sequences homologous to coding regions of transposable elements of the Ty1-Copia and Ty3-Gypsy superfamily.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de la familia Solanaceae

Solanaceae Juss. es una familia de plantas con importancia económica, florística, y etnobotánica (Hunziker, 2001). Esta familia abarca \pm 2300 especies, entre las más conocidas se incluyen *Capsicum annuum* L. (pimiento), *Nicotiana tabacum* L. (tabaco), *Solanum tuberosum* L. (papa) y *Solanum lycopersicum* L. (tomate), además de malezas (*Solanum viarum* Dunal, *Solanum elaeagnifolium* Cav.), plantas medicinales (*Physalis* L.) y ornamentales (*Petunia* Juss.) (Hunziker, 2001). A grandes rasgos, las relaciones filogenéticas dentro de la familia están resueltas, aunque aún quedan algunos grupos (géneros o tribus) cuya posición es incierta (Olmstead *et al.*, 2008; Särkinen *et al.*, 2013). Estudios moleculares recientes presentaron una filogenia datada destacando que la tasa de evolución en Solanáceas fue relativamente lenta (Särkinen *et al.*, 2013). En contraste, los mecanismos de evolución cromosómica no son completamente conocidos. Los números cromosómicos observados indican que el número básico es relativamente conservado a nivel de géneros y relativamente variable entre tribus y subfamilias (Oinuma, 1949; Moscone, 1992; Olmstead *et al.*, 1999; Hunziker, 2001; Stiefkens y Bernardello, 2002, 2006; Acosta, 2006). Esta variación permite caracterizar algunos taxones, por ejemplo $x = 12$ en las subfamilias Solanoideae, $x = 10$ en el género *Schizanthus* Ruiz y Pav. y la tribu Schwenckieae y $x = 8$ y $x = 7-10$ en la subfamilia Cestroideae y la tribu Petunieae, respectivamente (Olmstead *et al.*, 1999; Hunziker, 2001; Acosta, 2006).

Generalidades de la tribu Cestreae

La tribu Cestreae Dumort. es un grupo monofilético que incluye ca. 170 especies, clasificadas en los géneros *Cestrum* L., *Sessea* Ruiz y Pav. y *Vestia* Willd. (Romanutti y Hunziker, 1998; Hunziker, 2001; Montero-Castro *et al.*, 2006). El género *Cestrum* incluye hierbas, arbustos y árboles hasta de 12 metros de altura, con flores actinomorfas, corola tubular-infundibuliforme y fruto tipo baya (Romanutti y Barboza, 2013). Se diferencia de sus géneros hermanos *Sessea* y *Vestia* por el tipo de fruto y la forma de las semillas (Benítez de Rojas y Nee, 2001). *Sessea* está

restringida a zonas tropicales de América del Sur, especialmente en la región andina, e incluye unas 15 especies y *Vestia* es un género monotípico y endémico de la región centro - sur de Chile (Hunziker, 2001). La monofilia de *Cestrum* fue confirmada mediante análisis filogenético con secuencias de ADN (Montero-Castro *et al.*, 2006), pero las interrelaciones de sus especies aún no están claras. Si bien algunas especies son nativas de Argentina, otras como *C. nocturnum* L., *C. elegans* (Brongn.) Schltld., y *C. parqui* L'Hér. fueron introducidas. Algunas especies de *Cestrum* son de importancia económica ya que proporcionan la base para la extracción de compuestos activos como alcaloides, esteroides, saponinas y taninos y/o ecológica (en programas de reforestamiento) (Schultes y Raffauf, 1991; Van der Pijl, 1982). *Cestrum nocturnum* L. (“huele de noche”, “dama de noche” o “jazmín nocturno”) (Figura 1) es una especie ornamental mencionada para la Flora Argentina (Romanuti y Barboza, 2013), cuya distribución original es en regiones tropicales y subtropicales de América Central y Norte de Sudamérica.



Figura1. Flor y fruto de *Cestrum nocturnum*.

Características cromosómicas de la tribu Cestreae

Cestreae es desde el punto de vista citogenético excepcional dentro de Solanaceae y entre sus particularidades podemos mencionar: (1) número básico $x=8$ (Tschischow, 1956; Bolkhovskikh *et al.*, 1969; Goldblatt, 1984; Goldblatt y Johnson, 1991, 1996); (2) mayor tamaño cromosómico y genómico de la familia (Las Peñas *et al.*, 2006; Frossasco *et al.*, 2015); (3) patrones complejos de la

heterocromatina (Berg y Greilhuber, 1992, 1993; Fernandes *et al.*, 2009; Fregonezi *et al.*, 2006); (4) presencia de cromosomas B con singulares patrones de heterocromatina y distribución de ADNr 45S y 5S (Sykorova *et al.*, 2003a; Fregonezi *et al.*, 2004; Urdampilleta *et al.*, 2015); y (5) ausencia de telómeros tipo *Arabidopsis* (TTTAGGG)_n sustituidos por minisatélites ricos en A/T (Sykorova *et al.*, 2003 a, b; Peska *et al.*, 2015).

Cestrum nocturnum ha sido estudiada por Sharma y Sharma (1957) y Krishnakumar y Kuriachan (1998). Se describieron sus patrones de distribución de heterocromatina y localización de secuencias de ADN repetitivo por FISH (De Paula *et al.*, 2015; Urdampilleta *et al.*, 2015). Estos resultados mostraron un patrón complejo y variable de heterocromatina y distribución de ADN ribosómico (45S y 5S). La naturaleza variable de estas regiones, confirman que el ADN repetitivo en sus diferentes tipos (ADN ribosomal, ADN satélite y elementos transponibles) juega un rol importante en la diferenciación cariotípica en *Cestrum*, haciendo de este género un grupo de interés en el estudio de la evolución cromosómica así como el origen y diversidad de secuencias de ADN repetitivas.

El ADN repetitivo

El ADN repetitivo, según la organización y distribución, puede ser dividido en dos grandes grupos, en tándem (ej. ADNsat, microsatélites, ADN ribosomal 5S y 18-5,8-26S) o elementos dispersos (ETs) (Kubis *et al.*, 1998). El ADNsat es frecuentemente un componente del genoma especie o grupo-específico, consta de monómeros repetidos en tándem que frecuentemente varían de 135-195 a 315-375 pb (mono- o dinucleosomal) y forman bloques de heterocromatina constitutiva (Hemleben *et al.*, 2007; Sharma y Raina, 2005). Este tipo de ADN repetitivo suele ocupar regiones cromosómicas terminales o centroméricas y presentar una riqueza diferencial de bases de A y T (Macas *et al.*, 2002). Los ETs son ubicuos, abundantes (hasta el 80% del genoma) y están distribuidos irregularmente en el genoma vegetal tanto en regiones heterocromáticas como eucromáticas (Flutre *et al.*, 2012). Se dividen en dos clases según su mecanismo de transposición: la clase I

o retroelementos que utilizan como intermediario el ARN (mecanismo replicativo), mientras que la clase II o transposones no involucran ARN (mecanismo conservativo) (Kejnovsky *et al.*, 2012; Wicker *et al.*, 2007). En plantas, la porción mayoritaria de los ETs está constituida por los retroelementos de Clase LTR, que se caracterizan por presentar dos módulos, uno funcional (que codifica las proteínas necesarias para su replicación e inserción en una nueva porción del genoma) y el otro regulatorio (conformado por dos secuencias denominadas LTR que lindan el módulo funcional y que contienen todas las secuencias regulatorias para su activación) (Huang *et al.*, 2012). Dentro de esta clase, existen dos grandes superfamilias denominadas *Ty1-Copia* y *Ty3-Gypsy* que se distinguen entre sí según el ordenamiento de las regiones codificadoras (Wicker *et al.*, 2007) (Figura 2). Dentro de cada superfamilia existen un gran número de linajes evolutivos cuya última unidad es la familia, sinónimo de especie taxonómica. Las familias se definen según su homología a nivel de secuencia nucleotídica, siendo propuesta la regla "80-80-80" según la cual dos ET pertenecen a la misma familia si comparten, al menos, 80% de identidad y 80% de tamaño total (Wicker *et al.*, 2007). Cada familia de ETs evoluciona en forma conjunta con el organismo huésped (surgiendo a partir de otra familia o por transferencia horizontal, expandiéndose por multiplicación del número de copias y extinguiéndose por mutación, recombinación o *genome shuffling*), siendo muy característicos el número y frecuencia de las familia de ETs dentro de cada especie (Huang *et al.*, 2012).

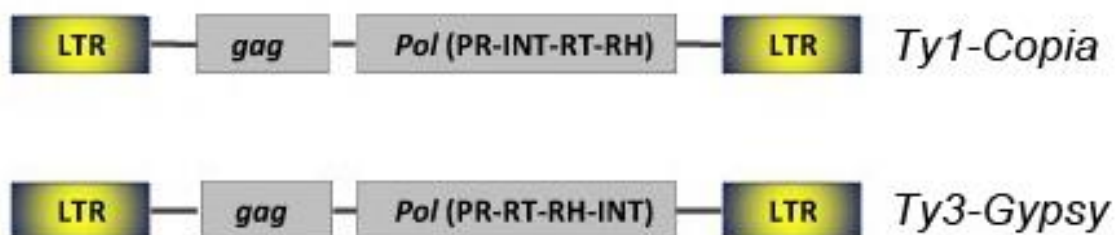


Figura 2. Esquema representativo de elementos transponibles de las superfamilias *Ty1-Copia* y *Ty3-Gypsy*. La diferencia entre ambas está dada por la posición relativa de las regiones codificadoras (http://gydb.org/index.php/LTR_retroelements).

Generalidades de los Cromosomas B

Los cromosomas B (Bs) fueron descubiertos en maíz por Longley (1927), y son definidos como componentes adicionales dispensables del genoma que exhiben generalmente una herencia no mendeliana. No se aparean ni recombinan con los cromosomas A durante la meiosis y generalmente difieren de ellos en tamaño, forma y secuencias de ADN (Datta *et al.*, 2014). La mayoría de los cromosomas B son heterocromáticos (Camacho *et al.*, 2000) y en general su cromatina es no codificante. La variación numérica, entre y dentro de individuos, está relacionada con procesos variados de inestabilidad meiótica y mitótica, y en la mayoría de los casos tienen poco o ningún efecto fenotípico (Beukeboom, 1994; Puertas, 2002).

Los cromosomas B son reportados en más del 15% de especies animales y vegetales (Beukeboom, 1994). En Angiospermas, el 8% de monocotiledoneas y 3% de eudicotiledoneas tienen cromosomas B (Acosta y Moscone, 2011). En Solanaceae han sido observados en los géneros *Cestrum* (Fregonezi *et al.*, 2004, Urdampilleta *et al.*, 2015), *Nierembergia* Ruiz y Pav.(Acosta y Moscone, 2011), *Combera* Sandwith., *Datura* L., *Fabiana* Ruiz y Pav., *Leptoglossis* Benth., *Nicandra* Adans., *Nicotiana* L., *Pantacantha* Speg., *Petunia* y *Solanum* L. (Acosta y Moscone, 2011).

Los cromosomas B pueden ser portadores de genes ribosómicos aunque generalmente inactivos (Beukeboom, 1994) con algunas excepciones (Acosta y Moscone, 2011). Existen ejemplos de cromosoma B portadores de genes que confieren resistencia a un antibiótico, producido por la planta hospedadora, en el hongo *Nectria haematococca* Berkeley & Broome, favoreciendo así su patogenicidad (Miao *et al.*, 1991). La influencia en la meiosis, aumentando la frecuencia de quiasmas y la recombinación es uno de los efectos más frecuentes de los cromosomas B (Valente *et al.*, 2016) tanto en plantas (Leach *et al.*, 2005) como animales (Berend *et al.*, 2001; Colombo y Confalonieri 2004). En *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758)(Acrididae) la frecuencia de quiasmas es afectada positivamente cuando los cromosomas B están en número impar (Camacho *et al.*, 2004). Pocas especies demostraron que la variación de cromosomas B pueda estar asociada con variaciones cualitativas, una de ellas es el cambio de coloración del fruto en *Haplopappus gracilis* (Nutt.) A. Gray asociada a la presencia de cromosomas B

(Ruíz Rejón *et al.*, 1987). La presencia de cromosomas B se puede correlacionar con la ocurrencia de varios tipos de anomalías en los cromosomas A, como ocurre en el saltamontes *Pycnogaster cucullata* (Charpentier, 1825) (Ruíz Rejón *et al.*, 1987). En otros organismos la presencia de Bs está asociada con el aumento de la heterocigosidad detectada mediante marcadores moleculares como RAPD (Tokarskaia *et al.*, 2000) e isoenzimas (Benito y Gripsrud, 1992). Los efectos que los B ejercen sobre el fenotipo pueden ser desfavorables, nulos o incluso ventajosos, cuando se presentan en dosis bajas; pero son siempre desfavorables cuando aumenta su número (Ruíz Rejón *et al.*, 1987).

Una de las hipótesis más ampliamente aceptadas sostiene que los cromosomas B se originan dentro de una especie a partir de los cromosomas A (Jones y Rees, 1982; Cuadrado y Jouve, 1994). Diferentes mecanismos fueron propuestos, los cuales están basados en rearrreglos cromosómicos, fragmentación cromosómica e hibridación interespecífica (Camacho *et al.*, 2000; Dhar *et al.*, 2002). Evidencias en *Crepis fuliginosa* Smith indican que rearrreglos cromosómicos como translocaciones desiguales que podrían haber reducido el número cromosómico y generado fragmentos céntricos que dieron origen a cromosomas B (Jones *et al.*, 2007). Los avances en la secuenciación genómica han acelerado enormemente la investigación molecular de los cromosomas B, indicando que estos son ricos en fragmentos génicos procedentes de los cromosomas A (Martis *et al.*, 2012; Valente *et al.*, 2014), y que muchos de ellos se transcriben (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2013). El tamaño del genoma contribuye de forma significativa a la presencia de cromosomas B, taxones con genoma relativamente grande tienden a tener más especies con cromosomas B que los taxones con genomas más pequeños (Palestis *et al.*, 2004).

El comportamiento de los cromosomas B en mitosis y meiosis es frecuentemente irregular, lo que les permite acumularse en la línea germinal, causando una herencia no mendeliana con tasas de transmisión superiores a las de los cromosomas normales (Camacho *et al.*, 2000). La ocurrencia de cromosomas B en varias especies parece estar relacionada con su alta tasa de transmisión (Jones, 1991). Sobre la base de la herencia mendeliana, en individuos portadores de un cromosoma B es esperable un proceso de deriva génica meiótica que transmita ese

cromosoma a la mitad de sus gametos. Algunos ejemplos de cromosomas B muestran altas tasas de transmisión meiótica, manifestando un proceso de acumulación (Camacho *et al.*, 2000). Los mecanismos relacionados con la acumulación meiótica son escasamente conocidos. En plantas fue observado que la acumulación de cromosomas B en diferentes tejidos puede estar relacionada con mecanismos de no disyunción mitótica (Houben, 2017).

La no disyunción mitótica es un mecanismo más frecuentemente observado en plantas, la acumulación post-meiótica comienza con la terminación de la meiosis y la activación de los primeros ciclos de mitosis (Jones, 1991; Camacho *et al.*, 2000). En plantas este proceso de no disyunción se ha descrito en *Crepis capillaris* (Parker *et al.*, 1989). La acumulación de cromosomas B por la no disyunción mitótica fue reportada en *Locusta migratoria* (Rothfels, 1950; Nur, 1969), sin embargo la estabilidad mitótica en animales es frecuentemente observada (Green *et al.*, 1993). En centeno fue observado que la no disyunción está relacionada a la presencia de un bloque de heterocromatina en el brazo largo de cromosomas B, la carencia de este bloque restablece disyunción normal de cromátidas (Banaei-Moghaddam *et al.* 2012). Estos estudios sugieren que la transcripción de secuencias de ADN repetitivo podrían controlar la no-disyunción de cromosomas B en mitosis (Carchilan *et al.*, 2007). Estos estudios generan interrogantes sobre el papel funcional del ADN repetitivo y su relación con la inestabilidad de los cromosomas B.

Los cromosomas B en *Cestrum*

En *Cestrum* fueron descritos cromosomas B acrocéntricos a submetacéntricos de en las especies *C. euanthes* Schltdl., *C. intermedium* Sendtn., *C. nocturnum*, *C. parqui* y *C. strigilatum* Ruiz y Pav. (Urdampilleta *et al.*, 2015; Vanzela *et al.*, 2017). El número de cromosomas B encontrados varía dentro y entre los individuos: 1-3 en *C. euanthes*, 1-10 en *C. nocturnum*, 1-3 en *C. parqui* (Urdampilleta *et al.*, 2015), 1 en *C. strigilatum* (Fregonezi *et al.*, 2004). La variación interespecífica del número de cromosomas B, pone en evidencia un proceso de

inestabilidad que podría estar relacionada a eventos de no-disyunción (Camacho *et al.*, 2000). En *C. intermedium* y *C. strigilatum* poseen un patrón de heterocromatina cuantitativamente variable (Fregonezi *et al.*, 2004). En *C. nocturnum*, *C. euanthes* y *C. parqui* fue detectado un patrón similar de ADN ribosómico 5S y 45S en posición terminal/subterminal, con pequeñas variaciones interespecíficas (Sykorova *et al.*, 2003; Urdampilleta *et al.*, 2015). Estudios con Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) mostraron que los cromosomas B de *C. strigilatum* y *C. intermedium* son ricos en elementos Ty3-Gypsy, con diferencias visibles en el número, la posición y el tamaño de las bandas (Fregonezi *et al.*, 2007). Estos resultados, indican que los cromosomas B poseen una tendencia a la acumulación de secuencias de ADN repetitivo derivadas de cromosomas del complemento normal.

HIPÓTESIS

El comportamiento de los cromosomas B en mitosis y meiosis en *C. nocturnum* es responsable de la variación numérica entre y dentro de individuos. Esta variación está relacionada con procesos de inestabilidad mitótica y meiótica que promueven la deriva o eventos estocásticos en la segregación de los cromosomas B. La naturaleza polimórfica y neutra de los cromosomas B permite y facilita la acumulación de diversos tipos de secuencias de ADN repetitivo derivadas del complemento cromosómico normal.

OBJETIVOS

Objetivo general

Contribuir al conocimiento de la estructura cariotípica de la especie *Cestrum nocturnum* y al estudio de los cromosomas B mediante técnicas citogenéticas y moleculares, analizando el comportamiento en mitosis y meiosis en relación al complemento cromosómico normal y su riqueza en ADN repetitivo.

Objetivo específico

- Estimar la variación numérica y estructura de cromosomas B de *C. nocturnum* mediante técnicas citogenéticas (HCl/Giemsa, Bando C-Giemsa, CMA/DAPI y NOR).
- Analizar el comportamiento de cromosomas B tanto en mitosis como en meiosis, mediante el análisis de raíces no pretratadas y botones florales.
- Aislar secuencias repetitivas (ADNsat y ET) del genoma de *C. nocturnum* y determinar su relación con cromosomas B, mediante el uso técnicas moleculares e hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material de estudio.

El material de estudio analizado fue obtenido de raíces de individuos cultivados de *C. nocturnum* (voucher Chiarini 501, CORD; cultivada en Valencia) en el invernáculo del Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV). Los estudios cromosómicos fueron realizados a partir de raíces de una planta madre (P) y 10 individuos (F₁) obtenidos de semillas de la planta madre P.

2. Preparaciones cromosómicas.

Para el recuento de cromosomas B fueron utilizadas raíces pretratadas con 8-hidroxiquinoleína (8Q) 0,002 M a 14°C durante 6-7 horas, fijadas en etanol:ácido acético (3:1) y conservadas a -20°C. Las preparaciones cromosómicas fueron realizadas con la técnica de HCL/Giemsa (Guerra, 1983), con pequeñas modificaciones. Los meristemas radicales fueron hidrolizados durante 10 minutos a 60°C en HCl 1N, y aplastados en ácido acético 45%. Los preparados fueron congelados en nitrógeno líquido para retirar sus cubreobjetos, coloreados con Giemsa al 2% y montados con Entellan (Merck). El número de cromosomas B fue contabilizado considerando tres niveles de variación, entre células de una misma raíz, entre raíces de un mismo individuo y entre individuos.

Estas preparaciones fueron utilizadas para analizar el cariotipo de todo el complemento, incluyendo cromosomas A y B, haciendo mediciones cromosómicas de 10 metafases en similar estado de condensación. Basadas en estas mediciones, se clasificaron los cromosomas según su índice braquial de acuerdo a Levan *et al.* (1964) y se construyó el cariograma organizando los cromosomas según su morfología y tamaño.

Para observar el comportamiento normal de los cromosomas B en la mitosis, las preparaciones cromosómicas fueron obtenidas con la técnica de HCl-Giemsa utilizando raíces fijadas etanol:ácido acético (3:1) sin pretratar con 8Q. Para observar el comportamiento de los cromosomas B en meiosis anteras de botones florales frescos fueron aplastadas con ácido acético 45%. Los preparados fueron congelados en nitrógeno líquido para retirar sus cubreobjetos, coloreados con Giemsa al 2% y montados con Entellan (Merck).

3. Bando cromosómico.

Para identificar las regiones organizadoras nucleolares (NOR) activas durante la interfase anterior, los preparados cromosómicos pretratados fueron teñidos con Bando Ag-NOR. Para llevarlo a cabo se utilizó el protocolo descrito por Guerra y Souza (2002) mediante la utilización de membranas de nylon y AgNO₃ 50%.

Para detectar regiones de heterocromatina constitutiva fue aplicada la técnica de bando C-Giemsa utilizado el protocolo descrito por Schwarzacher *et al.* (1980) para orquídeas.

El bando fluorescente CMA/DAPI fue realizado para examinar la presencia, el tipo y la distribución de heterocromatina constitutiva mediante la coloración con fluorocromos base-específicos CMA (Cromomicina A₃) y DAPI (4'-6- diamidino- 2- fenilindol) siguiendo el protocolo descrito por Schweizer *et al.* (1980).

4. Extracción de ADN genómico y construcción de bibliotecas de ADN repetitivo.

La extracción de ADN genómico se realizó con el método CTAB II descrito por Weising *et al.* (2005) a partir de tejido foliar fresco o seco en sílica gel. A partir del mismo se procedió con la elaboración de bibliotecas de ADN repetitivo siguiendo dos estrategias:

4.1. Aislamiento de ADN satélite (ADN_{sat}) con enzimas de restricción.

El ADN genómico fue digerido con las enzimas de restricción *AluI*, *BamHI*, *DraI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *HindIII*, *PvuII*, *RsaI*, *Sau3AI*, *XhoI*, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Promega). Cada reacción (210 µl) consistió: 132 µl de agua, 40 µl de Buffer, 4 µl de BSA, 14 µl de ADN y 10 µl de enzima. Se lo colocó en la estufa toda la noche a 37 °C con un agregado de 10 µl de enzima a las tres horas. La presencia de sitios de restricción en unidades de repetición permitió la purificación de ADN altamente repetitivo y su posterior clonación (Urdampilleta *et al.*, 2009). Los fragmentos de restricción seleccionados fueron purificados utilizando Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) y clonados utilizando el

vector pBluescript SK (+) (Addgene) y pJET 1.2/blunt en *E. coli* siguiendo los métodos descritos por Sambrook y Russell (2001).

Las reacciones (20 μ l para pBluescript SK(+) y 10 μ l para pJET 1.2/blunt) de ligación consistieron en:

> pBluescript SK (+): 2 μ l de pBKS digerido, 10 μ l de producto de ADN purificado, 1 μ l de ligasa, 2 μ l de buffer 10X y 5 μ l de agua. Se lo colocó toda la noche a 14 °C.

> pJET 1.2/blunt: 3,5 μ l de producto de ADN purificado, 0,5 μ l de ADN blunting enzyme, 5 μ l de buffer 2X. Luego se centrifugó, se incubó a 70 °C por 5 minutos y se hizo un shock térmico en hielo. Luego se agregó 0,5 μ l de pJET y 0,5 μ l de ligasa. Se incubó a temperatura ambiente (22 °C) por 5 minutos.

Para la clonación de plásmidos recombinantes fueron utilizadas células competentes de *E. coli* TOP10 pre-incubadas en hielo permitiendo que se descongelen durante 10 minutos. A 200 μ l de células competentes se adicionó 10 μ l del producto de ligación y se dejaron por 30 minutos en hielo. Posteriormente se sometieron a shock térmico a 42°C durante 45 segundos. Los tubos se incubaron nuevamente en hielo durante 5 minutos para permitir la transformación de las bacterias competente. A continuación se adicionó 500 μ l del medio LB + y se incubaron durante 1 hora a 37°C en agitación. Las células transformadas se inocularon en placas con 25 ml de medio LB con agar, 25 μ l ampicilina (100 mg/ml), 25 μ l de X-gal (50 mg/ml) y 100 μ l de IPTG (0,1 M). Las bacterias se distribuyeron por toda la placa mediante movimientos circulares con ansa Drigalsky estéril. Las placas se dejaron crecer toda noche a 37°C.

Los vectores recombinantes fueron purificados mediante Miniprep (Birnboim y Doly, 1979). Los clones de las colonias bacterianas (para el plásmido pBKS las colonias color blanco, y todas las colonias para el plásmido pJET) seleccionadas se cultivaron en 3 ml de LB y 3 μ l de ampicilina (100 mg/ml) durante toda la noche a 37°C a 200 rpm. Posteriormente se centrifugó durante 1 minuto a 13.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 100 μ l de Buffer de Resuspensión (50 mM de glucosa, 50 mM de Tris-HCl pH 8 y 10 mM de EDTA) frío a cada tubo y se homogenizó con vortex para resuspender el pellet. Se agregó 200 μ l de Buffer de Lisis (0,2 M NaOH y 1% SDS) a cada tubo y se mezcló por inversión

varias veces y se dejó reposar los tubos por 5 minutos. Luego se colocó 150 µl de Buffer de Neutralización helado (3 M de AcNa/AcH pH 5.5), se mezcló por inversión, se incubó durante 5 minutos a 4°C, se centrifugó durante 15 minutos a 13.000 rpm y luego se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo. Se agregó 1 ml de isopropanol frío, se mezcló por inversión 4 a 6 veces, se centrifugó por 30 minutos a 13.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm, se descartó el etanol, se dejó secar y se resuspendió en 50 µl de agua mQ y 2 µl de RNAsa. Posteriormente se incubó a 37°C durante 30 m. Por último se los almacenó a -20 °C.

La presencia de inserto fue verificada por PCR con primer M13F y M13R y pJETF y pJETR. La reacción (25 µl) de PCR utilizada para el plásmido pBKS contiene: 16,37 µl de agua, 5 µl de buffer 5X (Promega), 0,5 µl de dNTP, 1 µl de M13F, 1 µl de M13R, 0,125 µl de taq y 1 µl de ADN. La reacción de PCR utilizada para el plásmido pJET contiene: 15,87 µl de agua, 5 µl de buffer 5X (Promega), 2 µl de dNTP, 0,5 µl de pJETF, 0,5 µl de pJETR, 0,125 µl de GoTaq (Promega) y 1 µl de ADN. Todos los clones recombinantes positivos fueron secuenciados en Macrogen, Inc. (Seoul, South Korea).

4.2. Amplificación de Elementos Transponibles (ETs) con primer degenerados.

Utilizando el ADN genómico como molde, fueron amplificados por PCR fragmentos de ETs de regiones conservadas del dominio proteico de la Transcriptasa Reversa (RT). Para la amplificación de estas regiones fueron utilizados primers degenerados: GyRT1 y GyRT4 para Ty3/*Gypsy* (Friesen *et al.*, 2001) y Ty1-Upstream y Ty1-Downstream para Ty1/*Copia* (Flavell *et al.*, 1992).

La reacción de PCR (25 µl) que se realizó contiene: 0,375 µl de agua, 5 µl de buffer 5X (Promega), 1 µl de Mg (50 mM), 2,5 µl de cada primer (10 µM), 0,5 µl de dNTP, 0,125 µl de GoTaq (Promega) y 1 µl de ADN.

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis, utilizando geles de agarosa al 1% y clonados utilizando el vector pGEM-T Easy Vector (Promega). La reacción de ligación contiene: 0,5 µl de agua, 2,5 µl de buffer, 0,5 µl de pGEM-T, 1 µl del producto de PCR y 0,5 µl de T4 ligasa. Luego se colocó la reacción a 24 °C por una hora.

Para la clonación de plásmidos recombinantes, Miniprep, verificación de presencia de clones recombinantes y secuenciación, se procedió como en el ítem anterior.

5. Análisis de secuencias.

Las secuencias obtenidas fueron ensambladas, editadas y alineadas con SeqTrace 0.9.0 (Copyright © 2014 Brian J. Stucky) y Aliview (Larsson, 2014). Para todos los elementos de ADN repetitivo aislados se realizó una búsqueda bioinformática mediante la herramienta Blast (NCBI), con el fin de compararlas con secuencias descritas por otros autores disponibles en las bases de datos. Los ETs aislados fueron analizados con las secuencias traducidas a aminoácidos tomando como referencia los dominios de los retroelementos en plantas para cada grupo (*Gypsy* y *Copia*) y se realizó un análisis de neighbor-joining en Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013), calculando un bootstrap con 10000 réplicas. El análisis se realizó con las secuencias de aminoácidos propias junto con secuencias de referencia extraídas de la base de datos *Gypsy Database* (GyDB) (Llorens *et al.*, 2010) y NCBI. Todas las secuencias de este proyecto serán depositadas en GenBank (NCBI).

6. Hibridación in situ Fluorescente (FISH).

La técnica de FISH fue realizada siguiendo los protocolos descritos por Schwarzacher y Heslop-Harrison (2000), con pequeñas modificaciones. Regiones de ADN repetitivo (ADNsat y ETs) amplificadas por PCR fueron marcadas con Biotina (Bionick, Invitrogen) o Digoxigenina (DIG Nick translation mix, Roche) y utilizadas como sondas. Como sonda fueron utilizados los productos de PCR obtenidos con primers degenerados para la región RT de ETs, y los productos de PCR con primer M13 obtenidos de clones recombinantes y portadores de ADNsat y ETs. Las señales de hibridación fueron detectadas utilizando Avidina-FITC (Sigma) o anti-DIG-Rodamina (Roche) y los cromosomas coloreados con DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindol).

7. Observación.

Las preparaciones cromosómicas fueron observadas y fotografiadas con el microscopio BX61 (Olympus) acoplado con cámara monocromática y sistema de documentación digital Cytovision® (Leica Biosystems). Todas las imágenes fueron analizadas y editadas con los programas MicroMeasure v3.3 (Reeves, 2001), ImageJ 1.46 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) y Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated).

RESULTADOS

Análisis cariotípico de *C. nocturnum*

Se observó que el número diploide de *C. nocturnum* es $2n = 16 + 1-13 B$ (Figura 3A). El complemento cariotípico está compuesto por 8 pares de cromosomas A, de los cuales 7 son pares cromosómicos metacéntricos y un par es subtelocéntrico (Figura 3B). Además del complemento normal, el cariograma de los individuos analizados está integrado por cromosomas B metacéntricos (Figura 3B).

El largo de los cromosomas A varía de 6,87 μm a 11,28 μm (Tabla 1) y la asimetría cariotípica intracromosómica (A_1) es 0,23 e intercromosómica (A_2) es 0,15. El largo de los cromosomas B varía de 1,4 a 3 μm , en media unas 4,5 veces menores que los cromosomas A (Figura 3B, Tabla 1). Todos los cromosomas B presentan características morfológicas similares.

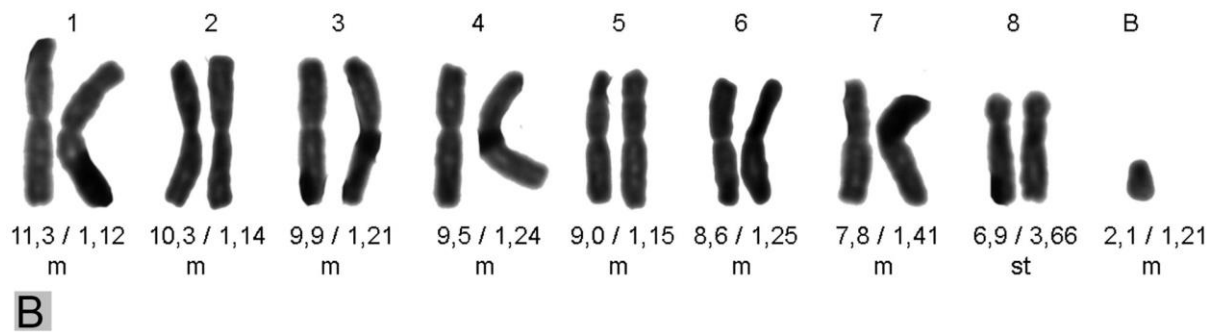
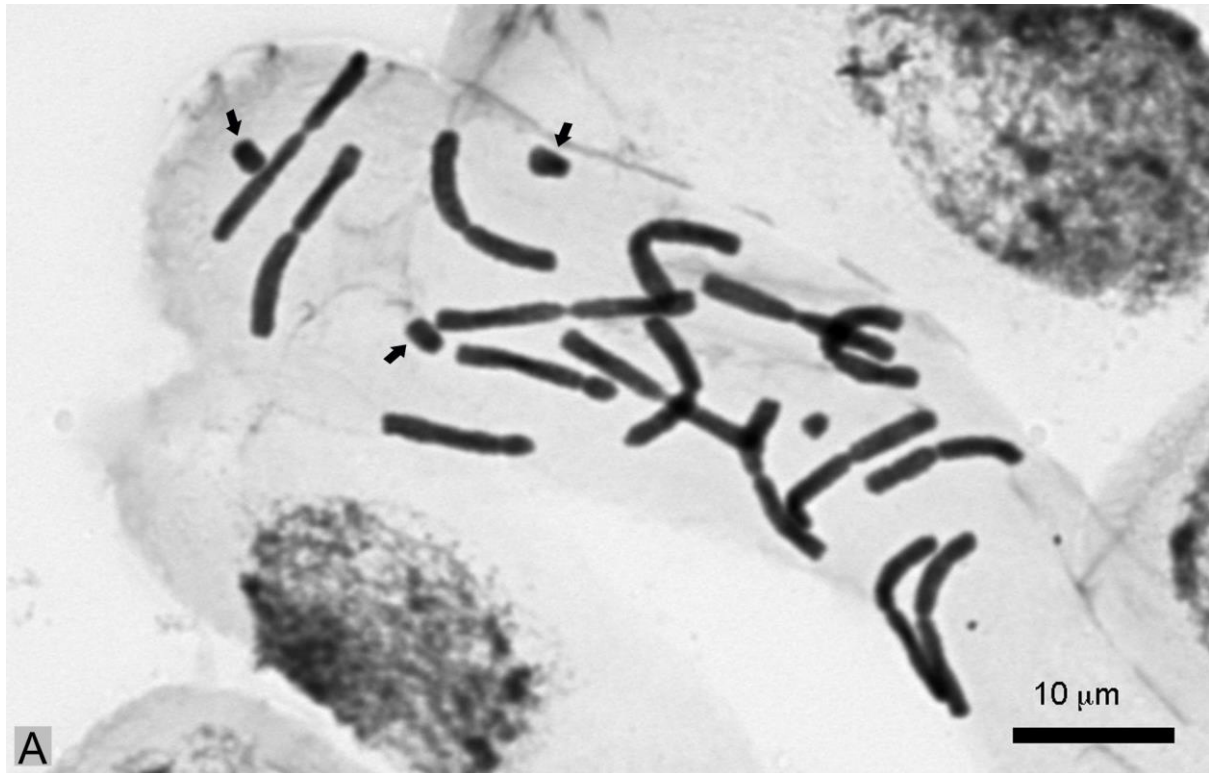


Figura 3. A: Célula en metafase y **B:** Cariograma de *Cestrum nocturnum*. En el cariograma se detalla la morfología de cada par cromosómico (8 pares) y de uno de los cromosomas B. Los números indican largo promedio del par cromosómico (μm) / índice braquial (L/S).

Par cromosómico	Largo total (μm) (Desv St)	Brazo largo (μm) (Desv St)	Brazo corto (μm) (Desv St)	Índice braquial (μm) (L/S)	Índice centromérico (S/(L+S))	Cromosomas
1	11,28 (1,77)	5,94 (0,9)	5,34 (0,95)	1,12	0,47	m
2	10,26 (1,24)	5,46 (0,66)	4,80 (0,63)	1,14	0,47	m
3	9,85 (1,13)	5,36 (0,65)	4,49 (0,61)	1,21	0,46	m
4	9,45 (1,01)	5,20 (0,83)	4,24 (0,5)	1,24	0,45	m
5	8,97 (0,86)	4,79 (0,52)	4,18 (0,45)	1,15	0,46	m
6	8,59 (0,79)	4,75 (0,45)	3,84 (0,5)	1,25	0,45	m
7	7,84 (0,65)	4,47 (0,52)	3,38 (0,61)	1,41	0,43	m
8	6,87 (0,6)	5,33 (0,54)	1,54 (0,43)	3,66	0,22	st
B	2,06 (0,31)	1,12 (0,16)	0,94 (0,17)	1,21	0,46	m

Tabla 1. Resultado morfométrico de los cromosomas de *Cestrum nocturnum*. m: metacéntrico, st: subtelocéntrico. Las medidas: largo total, brazo largo, brazo corto, índice braquial e índice centromérico son en μm . Se utilizó la clasificación de Levan *et al.* (1964).

Variación cuantitativa e inestabilidad de los cromosomas B en C. nocturnum

A partir de metafases mitóticas (Figura 4) de raíces pretratadas se ha contabilizado el número de cromosomas B de 251 células, de 32 raíces, de 9 individuos, en las cuales se ha observado que el número de cromosomas B varía de 0 a 13. La variación observada entre células y raíces de la planta madre es de 4 a 13 cromosomas B, mientras que la variación detectada entre células, raíces e individuos de la F₁ es de 0 a 9 (Tabla 2).

La Tabla 2 expresa los valores promedios (\bar{x}) y desvío estándar (σ) de números de cromosomas B para cada raíz y cada individuo analizado de la F₁ y la Tabla 3 expresa los valores correspondiente a la planta madre. El número promedio de cromosomas B de todas las raíces analizadas de la generación F₁ fue de 3,82, y el desvío estándar promedio por raíz fue de 0,72. Este valor representaría la variabilidad observada entre las células de una misma raíz (dentro de raíces). El número medio de cromosomas B, teniendo en cuenta la media por individuo, es de 3,69, siendo el desvío estándar 1,08. Este valor representaría la variabilidad observada entre individuos. Además, el número promedio de cromosomas B de las raíces analizadas de la planta parental (Tabla 3) fue de 8,01 y el desvío estándar fue de 1,29.

En la generación F₁ la variación encontrada entre células es de 0 a 9 cromosomas B, la variación entre las medias de raíces es de 6,75 Bs y entre las medias de individuos es de 3,13 Bs. La mayor variación en el número de cromosomas B (Tabla 2) es entre raíces de diferentes individuos. En la planta parental (Tabla 3) se observó que la variación entre las medias de raíces es de 9 cromosomas B y la media del individuo es de 8,01 Bs. La planta parental posee mayor media del número de cromosomas B que la generación F₁. La variación del número de cromosomas B entre raíces, para la planta parental y para la generación F₁, es de aproximadamente ± 1 Bs.

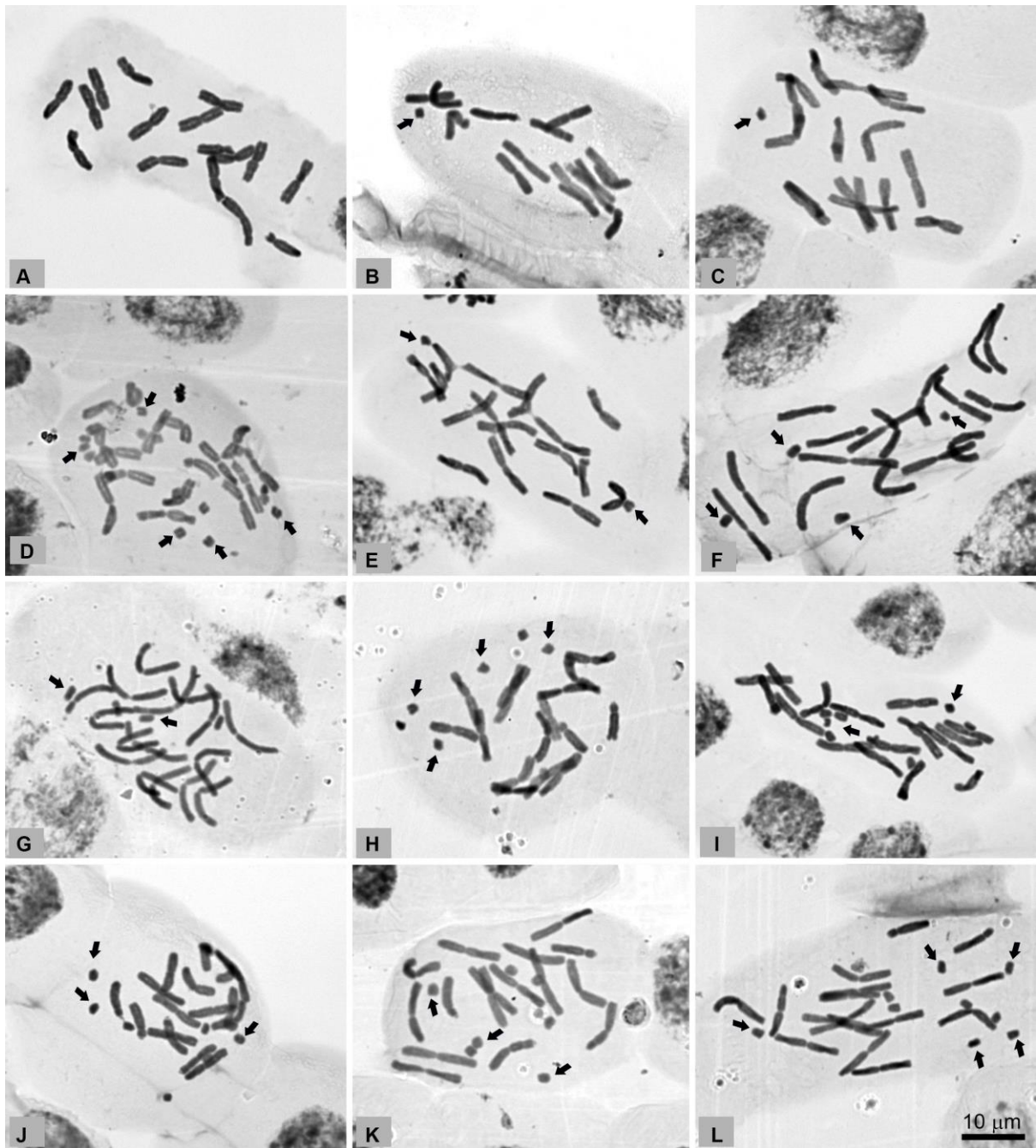


Figura 4. Variación de número de cromosomas B en metafases mitóticas de raíces pretratadas de *Cestrum nocturnum*. Las imágenes de la A a la K corresponden a individuos de la generación F₁, mientras que la imagen L corresponde a la planta parental. La imagen A no posee cromosomas B; la imagen B= 1 B; C= 2 Bs, D= 13 Bs; E= 2 Bs; F= 4 Bs; G= 5 Bs; H= 6 Bs; I= 7 Bs; J= 7 Bs; K= 8 Bs; L= 10 Bs.

Medición	Individuos		Raíz	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
1			3,00	1,00
2	5,63	2,42	8,50	0,71
3			4,40	0,55
4			6,60	0,55
5			2,00	0,00
6	2,50	0,74	3,25	0,97
7			3,00	0,00
8			1,75	0,96
9			3,86	0,90
10	3,14	0,77	3,22	1,30
11			2,33	0,58
12	2,76	0,25	2,78	0,67
13			2,50	0,71
14			3,00	0,00
15			2,36	0,67
16	4,92	1,72	5,06	1,43
17			4,29	0,76
18			6,71	1,30
19			6,20	0,79
20			3,00	1,22
21	2,57	0,61	2,14	0,69
22			5,48	0,81
23	3,85	1,19	3,00	0,63
24			4,00	0,82
25			2,91	0,70
26	3,84	0,84	5,43	1,09
27			3,40	0,52
28			4,00	0,76
29			3,07	0,26
30			3,67	0,78
31			3,50	1,00
32	4,00	0,00	4,00	0,00
Promedio	3,69	1,08	3,82	0,72

Tabla 2. Promedio y desvío estándar de cromosomas B de individuos de la generación F₁. \bar{x} : promedio σ : desvío estándar. En la columna raíz, cada medición muestra el promedio del número de cromosomas B por raíz y el promedio del desvío estándar. En la columna individuos, cada medición es el promedio del número de cromosomas B de las raíces de cada individuo y para cada una el promedio del desvío estándar.

Medición	Individuo		Raíz	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
1	8,01	3,94	9,14	3,53
2			13,00	0,00
3			4,00	0,00
4			5,91	1,64
Promedio			8,01	1,29

Tabla 3. Promedio y desvío estándar de cromosomas B de parental. \bar{x} : promedio σ : desvío estándar. En la columna raíz, cada medición muestra el promedio del número de cromosomas B por raíz y el promedio del desvío estándar. En la columna individuo, la medición es el promedio del número de cromosomas B de las raíces y el promedio del desvío estándar.

El análisis del comportamiento mitótico de los cromosomas B de *C. nocturnum* permitió detectar la ocurrencia de anomalías en la segregación (Figura 5), entre las que podemos mencionar: 1) pérdida de alineamiento de cromosomas B en la placa ecuatorial en una metafase, 2) condensación temprana y 3) migración temprana en relación al resto del complemento cromosómico sin separación de cromátidas hermanas. El análisis de los cromosomas B en la meiosis demuestra anomalías en su comportamiento durante la meiosis I, detectados especialmente por el apareamiento cromosómico durante la Diacinesis-Metafase I. La Figura 6 pone en evidencia la formación de univalente (I), bivalentes (II) y multivalentes, así como posibles asociaciones con los cromosomas del complemento A.

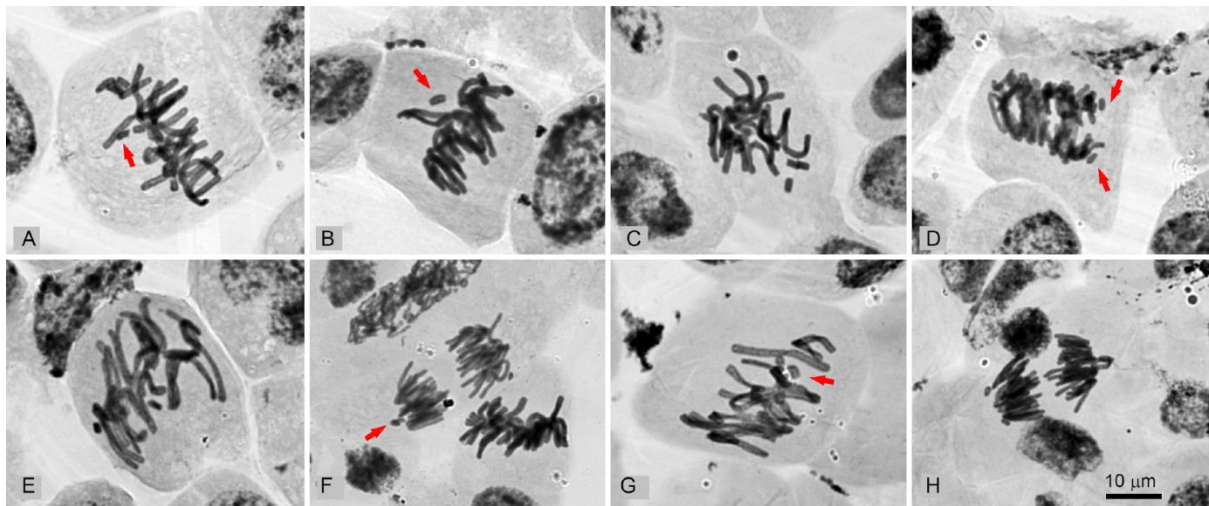


Figura 5. Mitosis de *Cestrum nocturnum*. Las imágenes A, B, C, D, E y G pertenecen a una metafase, mientras que las imágenes F y H pertenecen a una anafase tardía. Las flechas indican los cromosomas B.

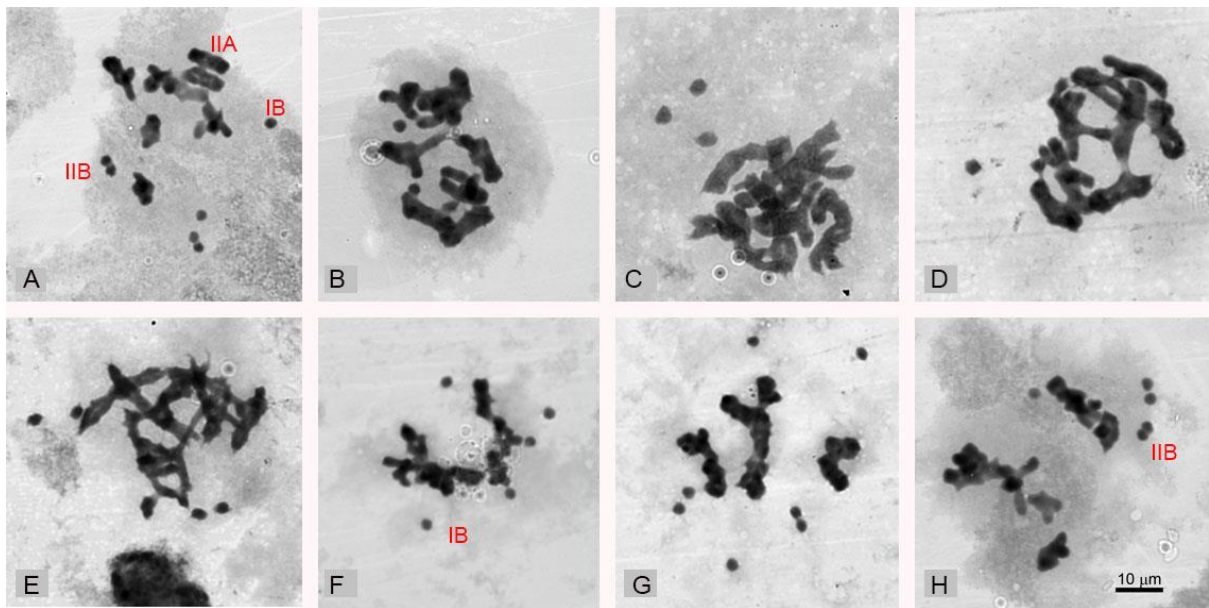


Figura 6. Comportamiento de los cromosomas B en Diacinesis-Metafase I durante la microesporogénesis de *Cestrum nocturnum*. En las imágenes se observa la formación de univalente (IB), bivalentes (IIB) y multivalentes.

Bandeo cromosómico

La técnica de Bandeo C-Giemsa (Figura 7 A) evidenció un patrón de bandas de heterocromatina en cuatro pares de cromosomas A y en todos los cromosomas B. De los cromosomas A que poseen regiones ricas de heterocromatina, tres pares son metacéntricos y un par subtelocéntrico. De los cromosomas metacéntricos, dos pares poseen bandas de heterocromatina en la posición terminal y un par presenta una banda en la región intercalar. El par cromosómico subtelocéntrico es heteromórfico y puede o no contener el bloque de heterocromatina en el brazo largo en posición terminal.

El patrón de Bandeo NOR observado en *C. nocturnum* es complejo (Figura 7 B). Bandas NOR son observadas en varios pares de cromosomas A y en todos los cromosomas B. Se observan bandas en regiones intercalares y además otras bandas en regiones terminales coincidiendo con regiones de heterocromatina.

La técnica de Bandeo CMA/DAPI (Figura 7 C, D) evidenció un patrón de bandas de heterocromatina presentes en algunos cromosomas A y en todos los cromosomas B. El bandeo indicó que hay dos tipos de patrón de heterocromatina, CMA⁺/DAPI⁺ y CMA⁰/DAPI⁺. Todos los cromosomas B poseen CMA⁺/DAPI⁺, dos pares de cromosomas A poseen CMA⁺/DAPI⁺, un par de cromosomas A posee CMA⁺/DAPI⁺ en posición terminal y CMA⁰/DAPI⁺ en posición intercalar.

En la figura 8 se observa un idiograma en el cual se representó el tamaño, forma y patrón de bandas de todo el complemento cromosómico, los cromosomas se sitúan alineados por el centrómero y con el brazo largo siempre hacia abajo. Todos los cromosomas B presentaron un patrón de bandeo similar.

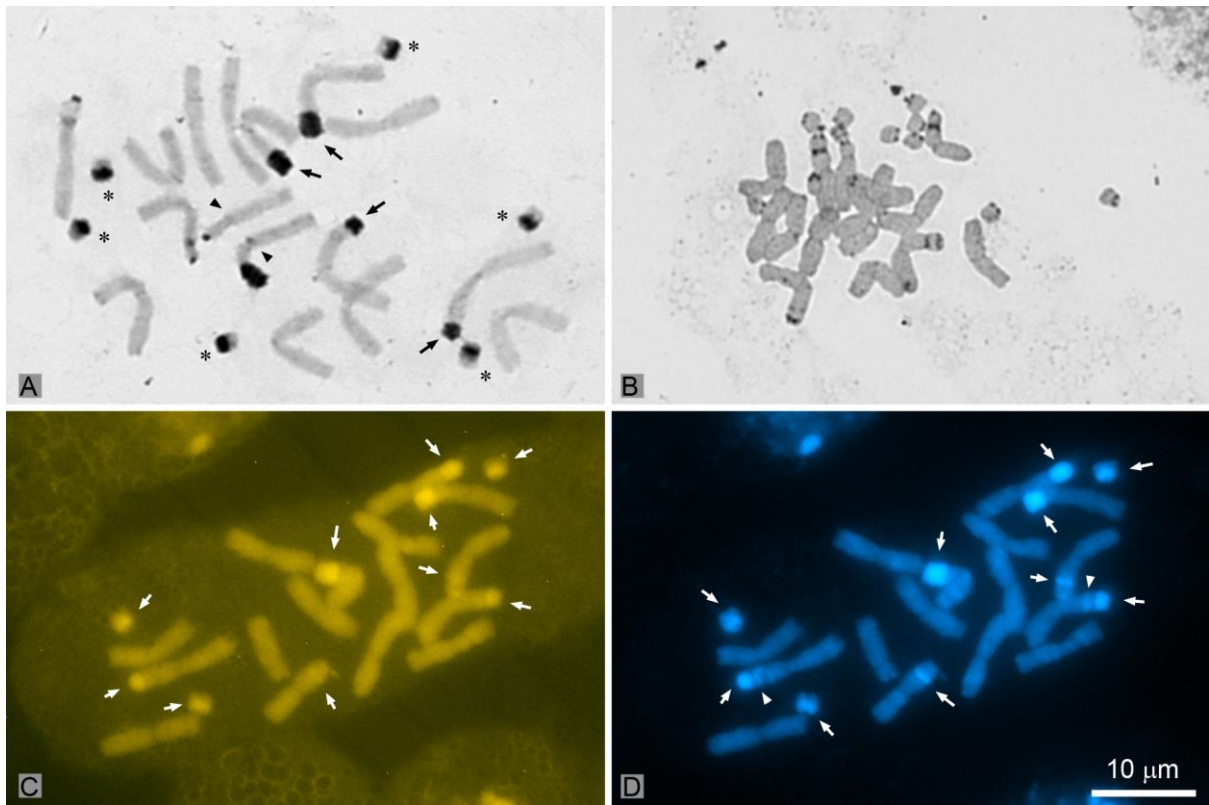


Figura 7. Bandeos cromosómicos: la imagen **A** pertenece al Bando C, la imagen **B** pertenece al Bando NOR, la imagen **C** pertenece al Bando CMA y la imagen **D** pertenece al Bando DAPI. El bando C presente en dos pares de cromosomas A (metacéntrico) (flecha), en un par de cromosoma A (subtelocéntrico) (cabeza de flecha) y en todos los cromosomas B (asterisco). Regiones AgNOR se encuentran presentes en tres pares de cromosomas A y en todos los cromosomas B. El bando CMA/DAPI muestra bandas CMA⁺/DAPI⁺ (flecha) en cromosomas A y B, mientras que CMA⁰/DAPI⁺ (cabeza de flecha) en un par de cromosoma A.

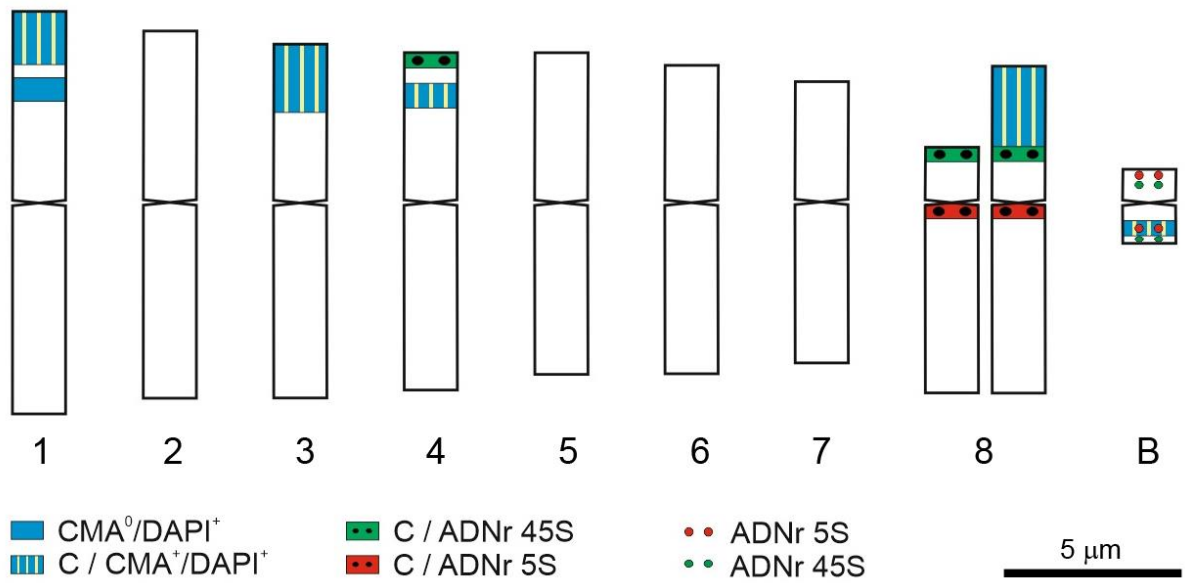


Figura 8. Idiograma de *Cestrum nocturnum* incluyendo cromosomas B. En el idiograma se detallan los bandeos cromosómicos C-Giemsa, C-CMA/DAPI y ADNr. La localización de los sitios de ADNr (5S y 45S) fueron obtenidos de Urdampilleta *et al.* (2015).

Aislamiento de ADN repetitivo en *C. nocturnum*

Aislamiento de ADN repetitivo en tándem con enzimas de restricción.

De las diferentes enzimas de restricción utilizadas (Figura 9), fue seleccionada *Bam*HI por su claro patrón en escalera de fragmentos de restricción, característico de ADN repetitivo en tándem. Estos fragmentos de restricción forman un patrón en escalera de bandas de aproximadamente 180 pb (Figura 10), de los cuales fueron purificados monómeros (180 pb) y los dímeros (360 pb). De la clonación pudieron aislarse 12 clones a partir de monómeros y 5 clones a partir de dímeros (Tabla 4). Las secuencias obtenidas de los 17 clones (Anexo 1) no presentaron las características y ni la repetitividad esperada para un ADN repetitivo en tándem.

Aislamiento de ETs con primers degenerados

Fragmentos de los dominios conservados de RT de retrotransposones Ty1-*Copia* y Ty3-*Gypsy* fueron amplificados usando los primers degenerados. Para el dominio RT de Ty1-*Copia* el fragmento amplificado fue de 260 pb, mientras que el de Ty3-*Gypsy* el fragmento fue de 420 pb (Figura 11).

Marcador BamHI HindIII EcoRI EcoRV XhoI Sau3AI DraI AluI PvuII RsaI HaeIII

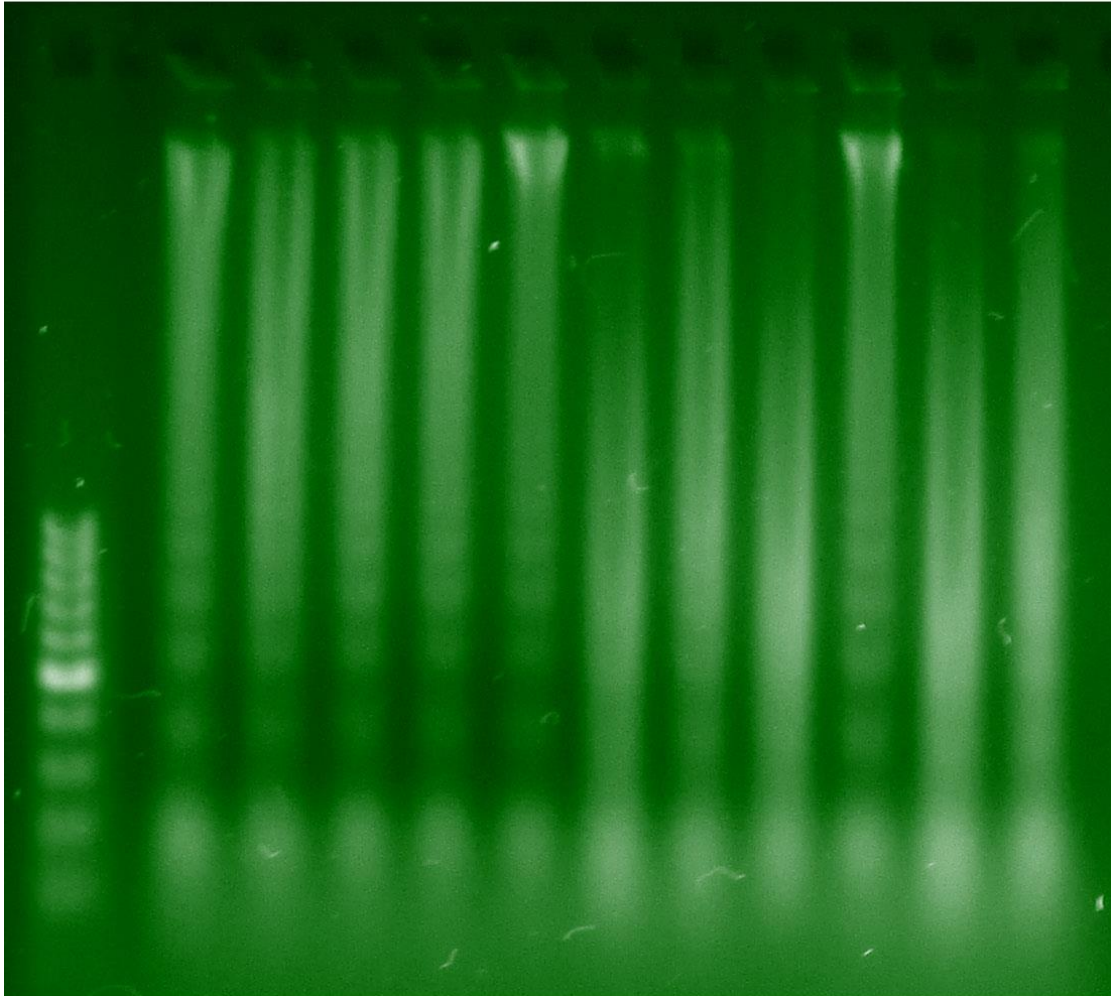


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de digestión de ADN genómico de *C. nocturnum* con diferentes enzimas de restricción. El carril de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb.

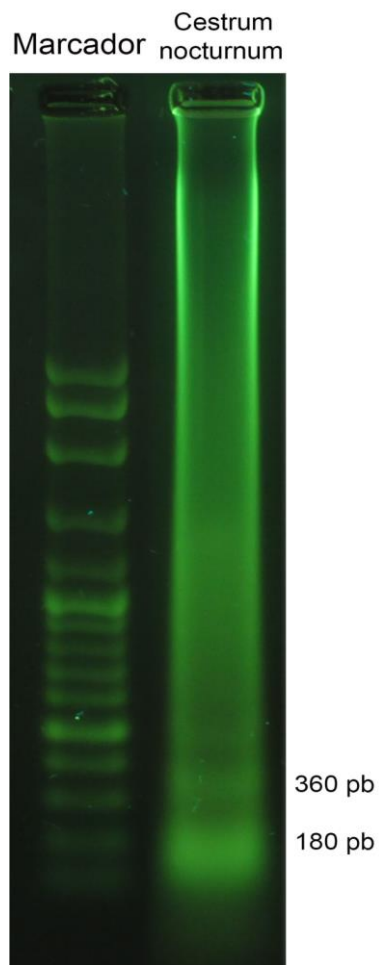


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de digestión de ADN genómico de *C. nocturnum* con enzima *Bam*HI para purificación de monómeros (180 pb) y dímeros (360 pb). El carril de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb.

Clones		
Clon	Fragmento	Plásmido
B2	Monómero	pBKs
B4	Monómero	pBKs
B6	Monómero	pBKs
B9	Monómero	pBKs
B10	Monómero	pBKs
B11	Monómero	pBKs
B12	Monómero	pBKs
B14	Monómero	pBKs
B17	Monómero	pBKs
B20	Monómero	pBKs
30	Monómero	pBKs
104	Monómero	pBKs
103	Dímero	pBKs
7'	Dímero	pJET
48	Dímero	pJET
66	Dímero	pJET
67	Dímero	pJET

Tabla 4. Clones obtenidos con enzima *Bam*HI. Doce clones son monómeros todos obtenidos con plásmido pBluescript II SK (+) (pBKs), y de los cinco clones que son dímeros, cuatro fueron obtenidos con el plásmido pJET y uno con el plásmido pBKs.

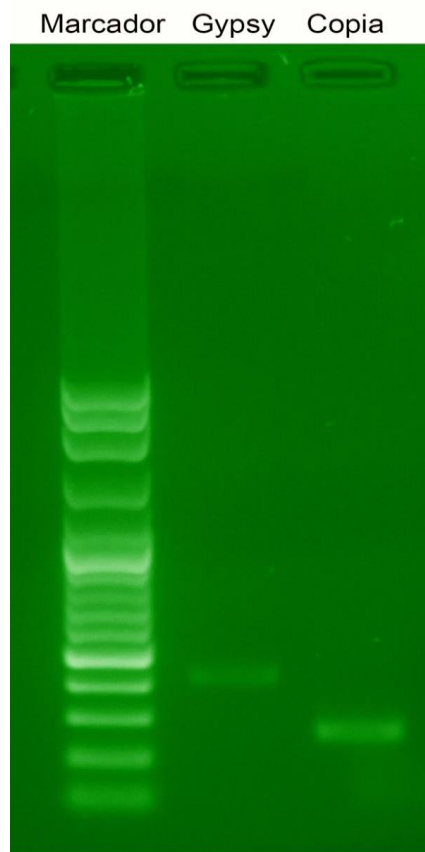


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de productos amplificados por PCR del dominio RT de retrotransposones de las superfamilias Ty1-*Copia* (260 pb) y Ty3-*Gypsy* (420 pb). El carril de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb.

A partir de fragmentos de PCR, purificados y clonados, fueron aislados 7 clones, tres de ellos pertenecen a Ty1-*Copia* (Ty1-*Copia* CN3 – Ty1-*Copia* CN4 – Ty1-*Copia* CN9) y cuatro a Ty3-*Gypsy* (Ty3-*Gypsy* CN5 – Ty3-*Gypsy* CN16 – Ty3-*Gypsy* CN23 – Ty3-*Gypsy* CN28). Las secuencias obtenidas se describen en el Anexo 2 y 3.

El análisis y comparación de secuencias de aminoácidos (Anexo 4) con las bases de datos (NCBI y Gydb) por análisis de agrupamiento permitió la identificación de los clados Tork/Tar (Ty1-*Copia*, Ty1-*Copia* CN3 y Ty1-*Copia* CN9) y Retrofit (Ty1-*Copia* CN2) para la superfamilia Ty1-*Copia*, y los clados Reina (Ty3-*Gypsy* CN5) y Del (Ty3-*Gypsy* CN16 – Ty3-*Gypsy* CN23 – Ty3-*Gypsy* CN28) para la superfamilia Ty3-*Gypsy* (Figura 12).

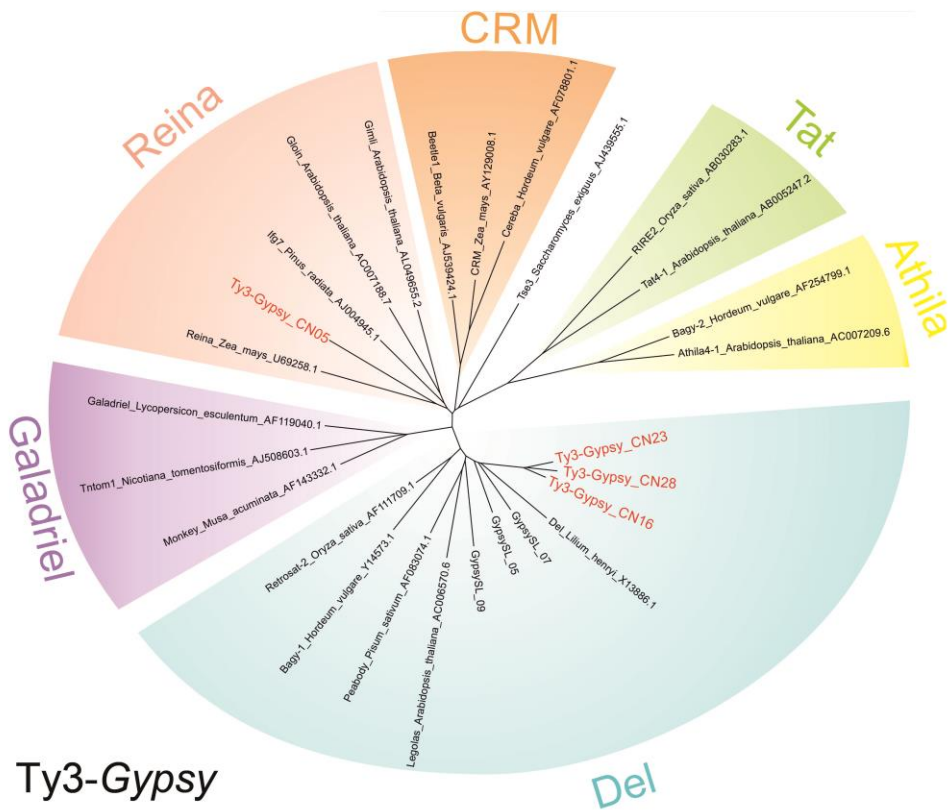
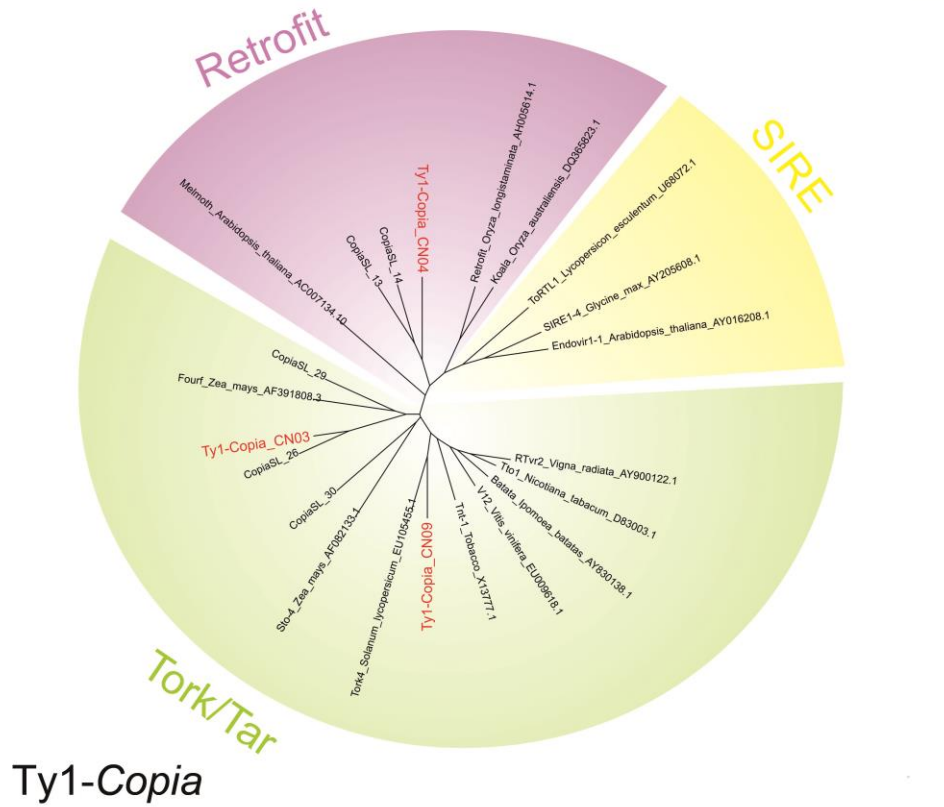


Figura 12. Análisis de Neighbor-Joining de las secuencias de aminoácidos de dominios RT de Ty1-Copia y Ty3-Gypsy.

Hibridación *in situ* fluorescente con ADN repetitivo

De los clones aislados de ADN repetitivo en tándem por el uso de enzimas de restricción no fue posible observar señales de hibridación que permitan localizar regiones de ADN satélite, ni en los cromosomas A ni en los cromosomas B. Los productos de PCR con primer degenerado de las regiones de RT de ETs, marcados con Biotina y Digoxigenina y utilizados como sonda en protocolos de FISH (Figura 13), permitieron la localización de señales de hibridación de ambas superfamilias de retrotransposones tanto en los cromosomas B y como en el extremo terminal de 2 o 3 pares de cromosomas A. Sin embargo, utilizando como sondas de clones específicos aislados no fue posible observar señales de hibridación.

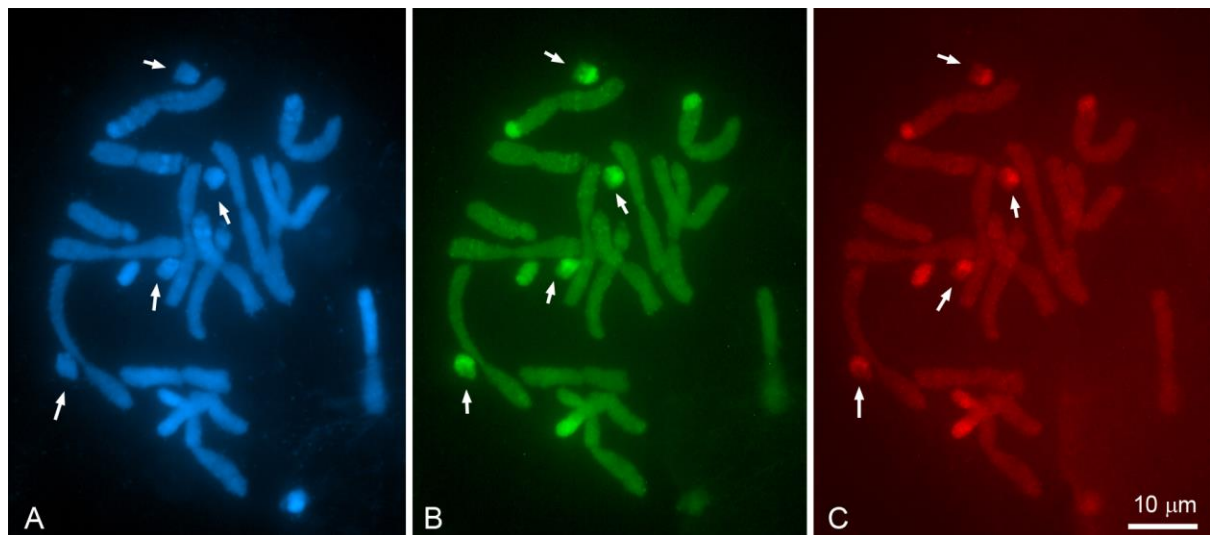


Figura 13. FISH de *C. nocturnum* utilizando como sonda fragmentos de Ty1-Copia y Ty3-Gypsy amplificados por PCR con primer degenerados. La imagen **A** corresponde a DAPI, la imagen **B** corresponde Ty3-Gypsy y la imagen **C** corresponde a Ty1-Copia.

DISCUSIÓN

Número cromosómico y cariotipo

Solanaceae exhibe una serie diploide que va de $x = 7$ a $x = 14$, aunque se han registrado otros números básicos como $x = 17$, $x = 19$ y $x = 23$ (Las Peñas *et al.*, 2006). La subfamilia Solanoideae posee un número básico conservado $x = 12$ (Olmstead y Palmer, 1992; Olmstead *et al.*, 1999). En la tribu Cestreae solo fue reportado $x = 8$ (Las Peñas *et al.*, 2006; Moscone, 1992). Como fue descrito por Sharma y Sharma (1957), *C. nocturnum*, posee $2n = 16$ cromosomas, es decir $x = 8$, de los cuales 7 pares corresponden a cromosomas metacéntricos y 1 par a cromosomas subtlocéntricos como sucede en la mayoría de especies del género *Cestrum*. Además de los cromosomas del complemento normal, *C. nocturnum* cuenta con la presencia de cromosomas supernumerarios o B, así como fue observado en otras especies del género *Cestrum* como *C. intermedium*, *C. parqui*, y *C. strigilatum* (Fregonezi *et al.*, 2004; Urdampilleta *et al.*, 2015).

En general, los cariotipos descritos para Solanaceae demuestran un patrón relativamente simétrico, con predominancia de cromosomas metacéntricos. Los complementos compuestos por cromosomas submetacéntricos y telocéntricos se encuentran en especies de *Nicotiana* (Burns, 1982) y en algunas de *Solanum* (Bernardello y Anderson, 1990; Acosta *et al.*, 2005). Los estudios en especies de la tribu Cestreae mostraron cariotipos altamente simétricos, siendo *Vestia foetida*, la especie basal del clado (Olmstead *et al.*, 1999), portadora del cariotipo más simétrico. Nuestros resultados indican que *C. nocturnum* posee uno de los cariotipos menos simétricos conocidos para Cestreae. Como fue propuesto por Stebbins (1971) en otras plantas, la diversificación del cariotipo en Cestreae puede haber estado acompañada de la tendencia hacia un ligero aumento de la asimetría y una mayor longitud del genoma.

Con respecto al tamaño de los cromosomas, Cestreae se caracteriza por poseer los mayores tamaños cromosómicos de Solanaceae. Los cromosomas estudiados de *C. nocturnum* son de tamaño grande, variando su tamaño de 6,87 a 11,28 μm , sin variar significativamente del resto de las especies estudiadas de Cestreae (Las Peñas *et al.*, 2006). Por lo general, el tamaño de los cromosomas A

es mayor que los cromosomas B. Jones (1995) estimó que aproximadamente el 40% de los taxones de angiospermas que poseen Bs tienen un tamaño de 4 a 3 veces menor que As. El estudio realizado en *C. nocturnum* estimo que los cromosomas B poseen un tamaño de 4,5 veces menor que cromosomas A. Estos resultados podrían estar relacionados con el origen de los cromosomas B a partir de cromosomas A. Distintos procesos podrían haber dado resultado al origen de los mismos mediante rearrreglos cromosómicos, fragmentación cromosómica e hibridación interespecífica (Camacho *et al.*, 2000; Dhar *et al.*, 2002).

Variación del número de cromosomas B

La variación del número de cromosomas B en *C. nocturnum* observado en el presente estudio fue de 0 a 13 cromosomas B. Esta variación numérica, aunque en menor magnitud, es observada en especies afines, 1-3 en *C. euanthes*, y 1-3 en *C. parqui* (Urdampilleta *et al.*, 2015). Una variación numérica significativa es frecuentemente observada en otras especies de vegetales y animales, como es el caso de 1-9 en *Scilla autumnalis* (Ruíz Rejón *et al.*, 1987), 0-6 en *Picea glauca* (Houben *et al.*, 2014), 0-8 en *Vulpes vulpes* (Houben *et al.*, 2014), 0-34 en *Zea mays* (Houben *et al.*, 2014), entre otros. La variación interespecífica del número de cromosomas B, es un evento común en especies portadoras y pone en evidencia un proceso de inestabilidad que podría estar relacionada a eventos de no-disyunción (Camacho *et al.*, 2000). Houben (2017) describió que el número máximo de Bs varía según la especie, por ejemplo el maíz, cebollín y centeno que podrían llegar hasta 34, 20 y 6 Bs y depende del equilibrio entre la acumulación de cromosomas B y los efectos negativos, especialmente en la fertilidad y el vigor.

Las especies portadoras de cromosomas B con comportamiento mitótico normal, mantienen todas las células del individuo con el mismo número de Bs durante su crecimiento y desarrollo (Houben *et al.*, 2014). Varios ejemplos demostraron que los cromosomas B pueden poseer inestabilidad mitótica como *C. intermedium*, *C. strigilatum* (Fregonezi *et al.*, 2004), *Locusta migratoria* (Nur, 1969) y poseer variabilidad numérica entre diferentes células y tejidos de un mismo individuo (Houben *et al.*, 2014), como es el caso de *C. nocturnum*. La variación intra e

interindividual del número de cromosomas B de la progenie de un individuo portador de Bs, permitiría estimar la variabilidad producto de procesos de inestabilidad mitótica y meiótica.

La variabilidad promedio entre individuos permitió estimar la inestabilidad meiótica, calculando el desvío estándar de las medias de cromosomas B observadas por individuo (1,08). Este parámetro sugiere que durante la formación de las gametas la segregación no sería estable, y el número de cromosomas B puede variar ± 1 cromosoma en relación a la media del individuo. El análisis citológico del comportamiento de los cromosomas B en meiosis revela anomalías durante la Diacinesis-Metáfase I, como formación de univalentes y multivalentes, así como posibles asociaciones con cromosomas A. Estudios recientes (Via do Pico *et al.*, 2016) demostraron que *Chrysolea verbascifolia* (Less.) posee un comportamiento meiótico con un alto porcentaje de cromosomas B fuera de placa en metafase I y además mostró la formación de cromosomas B univalentes y multivalentes, como así también es el caso de *Lolium multiflorum* (Techio *et al.*, 2010).

Los resultados sobre la variabilidad entre raíces permitió estimar la inestabilidad mitótica producto de posibles eventos de no-disyunción de cromátidas hermanas durante la mitosis. El promedio de los desvíos estándar (0,72) como resultado de la inestabilidad mitótica sugiere que el número de cromosomas B dentro de un individuo puede variar ± 1 cromosoma. La falta de alineamiento de los cromosomas B en la placa ecuatorial podría ser considerada como evidencia citológica de la inestabilidad mitótica, así como también la condensación y migración temprana seguida de un proceso de no-disyunción de cromátidas hermanas. Estos resultados sugieren que este proceso de inestabilidad podría estar sucediendo en todos los tejidos del individuo bajo mecanismos similares. Estudios recientes en especies portadores de cromosomas Bs, por ejemplo en centeno (Martis *et al.*, 2012; Banaei-Moghaddam *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2016), peces (Silva *et al.*, 2014; Valente *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2016), *Drosophila* (Bauerly *et al.*, 2014) y cérvidos (Makunin *et al.*, 2016), indican la existencia de secuencias de ADN que estarían relacionadas con el control de la no-disyunción (Houben, 2017).

El proceso de la no disyunción en la mitosis podría estar controlado por la transcripción de secuencias de ADN repetitivo (Carchilan *et al.*, 2007). Estudios recientes proponen secuencias propias de cromosomas B serían responsables de la no-disyunción de cromátidas en la mitosis. Estudios en *Secale cereale* destacaron que la presencia de un bloque de heterocromatina en los cromosomas B estaría relacionado con el proceso de no disyunción en la mitosis, y la carencia de este bloque restablece disyunción normal de cromátidas (Banaei-Moghaddam *et al.* 2012). Estos estudios generan interrogantes sobre el papel funcional del ADN repetitivo y su relación con la inestabilidad de los cromosomas B (Houben *et al.*, 2014, 2017).

Bandeos cromosómicos y ADN repetitivo

El análisis cariotípico de las especies conocidas de *Cestrum* permitió reconocer diferentes familias de heterocromatina, bandas C-Giemsa, bandas ricas en GC asociadas con regiones organizadoras nucleolares (NOR), bandas ricas en GC no asociadas a NOR, bandas ricas en AT asociadas con regiones sensibles al frío (CSR), bandas neutras C-GC / AT (Berg y Greilhuber, 1992, 1993; Fregonezi *et al.*, 2004; Fregonezi *et al.*, 2006). La técnica de Bando C-Giemsa y C-CMA/DAPI evidenció un patrón de bandas de heterocromatina prominentes en cromosomas A y B. Indicando que los cromosomas B son ricos en ADN repetitivo. En general, las familias de ADN repetitivo de los cromosomas B son similares a las de los cromosomas A (Fregonezi *et al.*, 2007; Vanzela *et al.*, 2017). Las especies de *Cestrum* contienen más de una familia de ADN repetitivo (Fregonezi *et al.*, 2007). Estos resultados son comparables con los obtenidos por Fregonezi *et al.* (2004), que destacan la presencia de grandes bloques de heterocromatina en cromosomas B de *C. intermedium* y *C. strigilatum*.

Los cromosomas B en *C. nocturnum*, así como en otras especies de *Cestrum* (*C. euanthes* y *C. parqui*) son portadores de secuencias de ADN ribosómico (45S y 5S en posición terminal/subterminal) (Sykorova *et al.*, 2003; Urdampilleta *et al.*, 2015). El análisis con la técnica de bandeo NOR, indica que los sitios de ADN_r de los cromosomas B podrían ser activos, sin embargo la coloración de otros bloques

de heterocromatina no permite definir esta característica con certeza. La posible actividad de los sitios de ADN en *Cestrum* aún no fue bien esclarecida. Otros cromosomas B en solanaceae poseen secuencias de posiblemente ADNr activas como *C. intermedium*, *C. strigilatum* (Fregonezi *et al.*, 2004) y *Nierembergia aristata* (Acosta y Moscone, 2011).

Las estrategias desarrolladas en este trabajo para el aislamiento y caracterización de ADN repetitivo en tándem no permitieron aislar secuencias de ADN satélite propias de los cromosomas B. Las secuencias aisladas mediante el uso de enzimas de restricción no presentaron las características y ni la repetitividad esperada para un ADN repetitivo en tándem. Las secuencias obtenidas de los 17 clones (Anexo 1) no corresponden con las características de un ADN satélite. Se requerirán nuevos estudios o con métodos alternativos (Ej. micromanipulación cromosómica, Next Generation Sequencing) para poder aislar secuencias relacionadas con ADN repetitivo en tándem.

El uso de primers para la región codificante (RT) permitió detectar una evidente riqueza de secuencias de ETs asociadas a bloques de heterocromatina, tanto en cromosomas A como B. En este estudio se observó que los productos de PCR con primer degenerado permitió la localización de señales de hibridación de dos superfamilias de retrotransposones (Ty3-Gypsy y Ty1-Copia) en los cromosomas B de *C. nocturnum*.

Los retrotransposones son elementos genéticos móviles que están muy extendidos entre los eucariotas (Kumar *et al.*, 1999). Los mismos se dividen en dos superfamilias Ty1-Copia y Ty3-Gypsy, que se caracterizan por las propiedades de universalidad, alto número de copias y sitios de inserción única en genomas de plantas (Schulman *et al.*, 2012). Los elementos de Ty3-Gypsy están menos estudiados que los de Ty1-Copia, se ha demostrado que ambos se encuentran dispersos en el genoma (L'Homme *et al.*, 2000). Ty3-Gypsy y otros retrotransposones han sido caracterizado en algunos representantes de Solanaceae, como *Solanum tuberosum* y *Lycopersicum esculentum* (Van Sluys *et al.*, 2001). Además, los retroelementos de Ty3-Gypsy se encuentran en el genoma de *C. strigilatum* y *C. intermedium* distribuidos a lo largo de los cromosomas, con

diferencias visibles en el número, la posición y el tamaño de bloques (Fregonezi *et al.*, 2007) y ambas especies poseen una concentración de estos elementos en algunas regiones terminales, asociadas con NOR, que también están asociadas con heterocromatina rica en GC (Fregonezi *et al.*, 2004). Estos resultados, indican que los cromosomas B poseen una tendencia a la acumulación de secuencias de ADN repetitivo derivadas de cromosomas del complemento normal.

El análisis filogenético con secuencias de aminoácidos de Ty1-*copia* y Ty3-*Gypsy* obtenidas de clones individuales, y comparadas con secuencias de otras especies depositadas en bases de datos (GenBank, GyDb, Giri RepBase), permitió reconocer diferentes familias de ETs. De la superfamilia Ty3-*Gypsy* fueron reconocidas secuencias de las familias Tork/Tar y Retrofit, mientras que para Ty1-*Copia* fueron reconocidas secuencias de Reina y Del., aunque cada clon de cada familia por separado no mostró patrones definidos de hibridación. Esto podría deberse a que los clones aislados no son parte significativa de los bloques de heterocromatina o porque es necesario el conjunto del producto de amplificación para que las señales de hibridación sean evidentes. Para poder tener una respuesta más certera es necesario hacer nuevas clonaciones para obtener más información. Así también, *C. strigilatum* y *C. intermedium* poseen retrotransposones Ty3-*Gypsy* en cromosomas B, lo que indica que estos segmentos repetitivos pueden contribuir a la formación y estabilización de los cromosomas B en estas especies, y que esto podría haber ocurrido a través de la amplificación de segmentos existentes en los cromosomas del complemento normal (Fregonezi *et al.*, 2007). Se han hecho análisis filogenéticos similares de secuencias de aminoácidos de Ty1-*Copia* en *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, el cuál reveló que los retrotransposones Ty1-*Copia* son transcripcionalmente activos durante el desarrollo normal de las plantas de té (Yaoa *et al.*, 2017). Estudios recientes demostraron que secuencias de ADN repetitivo presentes en cromosomas B de *Secale cereale* son activos en cuanto a la transcripción, controlan la no-disyunción y tienen homología con algunas regiones codificadoras de retrotransposones (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2012).

Finalmente, podría decirse que la variación del número de cromosomas B en *C. nocturnum* podría estar influenciada por procesos anormales que promueven la inestabilidad mitótica y meiótica. La abundancia de ADN repetitivo podría tener

alguna relación con los eventos que promueven la no-disyunción, alterando la segregación normal de los cromosomas B. El ADN repetitivo, en sus diferentes tipos, juega un rol importante haciendo esta especie de interés en el estudio de la evolución cromosómica así también como en el origen y en la diversidad de secuencias de ADN repetitivas. Para tener datos más certeros y aún con más exactitud en ellos, se debería observar más cantidad de individuos, ampliar la biblioteca de ADN repetitivo usando estrategias alternativas como la micromanipulación y NGS como fue usado en otras especies.

CONSIDERACIONES FINALES

Cestrum nocturnum posee cromosomas B metacéntricos de 4,5 veces más pequeños que los cromosomas A

La variación numérica de cromosomas B, entre y dentro de individuos de *C. nocturnum*, está relacionada con procesos de inestabilidad mitótica y meiótica.

Los cromosomas B de *C. nocturnum* son portadores de regiones de ADN ribosómico que podrían ser funcionalmente activos.

El patrón de bandas de heterocromatina observado indica que los cromosomas B son ricos en ADN repetitivo, posiblemente con arreglos ricos en AT y GC.

Las regiones de heterocromatina observadas en cromosomas B y en algunos cromosomas A demostraron la presencia de secuencias homólogas a regiones codificantes de ETs Ty1-*Copia* y Ty3-*Gypsy*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, M. C. (2006). Estudio cromosómico en *Nierembergia* y géneros afines (Nicotianeae-Solanaceae). Tesis Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Universidad Nacional de Córdoba.
- Acosta, M. C. y Moscone, E. A. (2011). B Chromosomes in *Nierembergia aristata* (Solanaceae): Nucleolar Activity and Competition with the A Chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 132:105-112.
- Acosta, M. C., Bernardello, G., Guerra, M. y Moscone, E. A. (2005). Karyotype analysis in several South American species of *Solanum* and *Lycianthes rantonnei* (Solanaceae). *Taxon*, 54:713-723.
- Banaei-Moghaddam, A. M., Meier, K., Karimi-Ashtiyani, R. y Houben, A. (2013). Formation and expression of pseudogenes on the B chromosome of rye. *The Plant Cell*, 25:2536-2544.
- Banaei-Moghaddam, A. M., Schubert, V., Kumke, K., Weib, O., Klemme, S., Nagaki, K., Macas, J., González-Sánchez, M., Heredia, V., Gómez-Revilla, D., González-García, M., Vega, J. M., Puertas, M. J. y Houbena, A. (2012). Nondisjunction in Favor of a Chromosome: The Mechanism of Rye B Chromosome Drive during Pollen Mitosis. *The Plant Cell*, 24:4124-4134.
- Bauerly, E., Hughes, S. E., Vietti, D. R., Miller, D. E., McDowell, W. y Hawley, R. S. (2014). Discovery of supernumerary B chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 196:1007–1016.
- Benítez de Rojas, C. y Nee, M. (2001). The Neotropical genus *Sessea* (Solanaceae): a preliminary survey. In: Van den Berg, R. G., Barendse, G. W. M., Van den Weerden, G. M. y Mariani, C. (Eds). *Solanaceae V. Advances in Taxonomy and Utilization*, 153-159.
- Benito, G. R. y Gripsrud, G. (1992). The expansion of foreign direct investments: discrete rational location choices or a cultural learning process?. *Journal of International Business Studies*, 23:461-476.

Berend, S. A., Hale, D. W., Engstrom, M. D. y Greenbaum, I. F. (2001). Cytogenetics of collared lemmings (*Dicrostonyx groenlandicus*). II. Meiotic behavior of B chromosomes suggests a Y-chromosome origin of supernumerary chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 95:85-91.

Berg, C. y Greilhuber, J. (1992). Cold-sensitive chromosome regions and their relation to constitutive heterochromatin in *Cestrum parqui* (Solanaceae). *Genome*, 35:921-930.

Berg, C. y Greilhuber, J. (1993). Cold-sensitive chromosome regions and heterochromatin in *Cestrum* (Solanaceae): *C. strigillatum*, *C. fasciculatum*, and *C. elegans*. *Plant Systematics and Evolution*, 185:133-151.

Bernardello, L. M. y Anderson, G. J. (1990). Karyotypic studies in *Solanum* section basarthrum (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 420-431.

Beukeboom, L. W. (1994). Bewildering Bs: an impression of the 1st B-chromosome conference. *Heredity*, 73:328-336.

Bimboim, H. C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7:1513-1523.

Bolkhovskikh, Z., Grif, V., Matvejeva, T. y Zakharyeva, O. (1969). Chromosome numbers of flowering plants. *Chromosome numbers of flowering plants*. Nauka, Leningrand, 1-926.

Burns, J. A. (1982). The chromosomes of *Nicotiana africana* Merxm.: a recently discovered species. *Journal of Heredity*, 73:115-118.

Camacho, J. P. M., Perfectti, F., Teruel, M., López-León, M. D. y Cabrero, J. (2004). The odd-even effect in mitotically unstable B chromosomes in grasshoppers. *Cytogenetic and Genome Research*, 106:325-331.

Camacho, J. P. M.; Sharbel, T. F.; y Beukeboom, L. W. (2000). B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 355:163-178.

Carchilan, M., Delgado, M., Ribeiro, T., Costa-Nunes, P., Caperta, A., Morais-

Cecílio, L., Jones, R. N., Viegas, W.b... y Houben, A. (2007). Transcriptionally active heterochromatin in rye B chromosomes. *The Plant Cell*, 19:1738-1749.

Colombo, P. y Confalonieri, V. (2004). Cytogeography and the evolutionary significance of B chromosomes in relation to inverted rearrangements in a grasshopper species. *Cytogenetic and Genome Research*, 106:351-358.

Cuadrado, A. y Jouve, N. (1994). Highly repetitive sequences in B chromosomes of *Secale cereale* revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Genome*, 37:709-712.

Datta, A. K., Das, D., Gupta, S., Sha, A., Paul, R. y Sengupta, S. (2014). B Chromosomes in Angiosperm—a Review. *Cytology and genetics*, 50:60-71.

De Paula, A. A., Fernandes, T., Vignoli-Silva, M. y Vanzela, A. L. L. (2015). Comparative cytogenetic analysis of *Cestrum* (Solanaceae) reveals different trends in heterochromatin and rDNA sites distribution. *Plant Biosystems*, 149:976-983.

Dhar, M. K., Friebe, B., Koul, A. K. y Gill, B. S. (2002). Origin of an apparent B chromosome by mutation, chromosome fragmentation and specific DNA sequence amplification. *Chromosoma*, 111:332-340.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32:1792-1797.

Fernandes, T., Rego, L. D. N. A. D., Nardy, M., Yuyama, P. M. y Vanzela, A. L. L. (2009). Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) revealed by fluorescent chromosome banding and FISH. *Genetics and Molecular Biology*, 32:320-327.

Flavell, A. J., y Smith, D. B. (1992). ATy1-*Copia* group retrotransposon sequence in a vertebrate. *Molecular and General Genetics*, 233:322-326.

Flutre, T., Permal, E. y Quesneville, H. (2012). Transposable element annotation in completely sequenced eukaryote genomes. In *Plant Transposable Elements*, 17-39.

Fregonezi, J. N., Fernandes, T., Domingues, Torean, J. M., Vieira, O. y Vanzela, A. L. L. (2006). Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on physical mapping of repetitive DNA. *Genetics and Molecular Biology*, 29:97-104.

Fregonezi, J. N., Rocha, C., Torezan, J. M. D. y Vanzela, A. L. L. (2004). The occurrence of different Bs in *Cestrum intermedium* and *C. strigilatum* (Solanaceae) evidenced by chromosome banding. *Cytogenetic and Genome Research*, 106:184-188.

Fregonezi, J. N., Vilas-Boas, L. A., Fungaro, M. H. P., Gaeta, M. L. y Vanzela, A. L. L. (2007). Distribution of a Ty3/gypsy-like retroelement on the A and B-chromosomes of *Cestrum strigilatum* Ruiz y Pav. and *Cestrum intermedium* Sendtn. (Solanaceae). *Genetics and Molecular Biology*, 30:599-604.

Friesen, N., Brandes, A., y Heslop-Harrison, J. S. (2001). Diversity, origin, and distribution of retrotransposons (*gypsy* and *copia*) in conifers. *Molecular Biology and Evolution*, 18:1176-1188.

Frossasco, A., Trenchi, A. y Urdampilleta, J. D. (2015). Estimación del tamaño del genoma en especies de la tribu Cestreae (Solanaceae) mediante citometría de imagen. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 50:353-360.

Goldblatt, P. (1984). Index to plant chromosome numbers 1979-1981. Monographs in Systematic Botany from Missouri Botanical Garden 8, St. Louis.

Goldblatt, P. y Johnson, D. E. (1991). Index to plant chromosome numbers, 1988-1989.

Goldblatt, P. y Johnson, D. E. (1996). Index to plant chromosome numbers, 1992-1993. Missouri Botanical Garden.

Green, D. M., Zeyl, C. W. y Sharbel, T. F. (1993). The evolution of hypervariable sex and supernumerary (B) chromosomes in the relict New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*. *Journal of Evolutionary Biology*, 6:417-441.

Guerra, M. S. (1983). O uso do Giemsa em Citogenética Vegetal: comparacao entre a coloracao simples e o bandeamento. *Ciencia e Cultura*, 35:190-193.

Guerra, M. y Souza, M. J. (2002). Como Observar Cromossomos: Um Guia de Técnicas em Citogenética Vegetal Animal e Humana. FUNPEC Editora, Ribeirão Preto.

Hemleben, V., Kovarik, A., Torres-Ruiz, R. A., Volkov, R. A. y Beridze, T. (2007). Plant highly repeated satellite DNA: molecular evolution, distribution and use for identification of hybrids. *Systematics and Biodiversity*, 5:277-289.

Houben, A. (2017). B Chromosomes—A Matter of Chromosome Drive. *Frontiers in Plant Science*, 8:210.

Houben, A., Banaei-Moghaddam, A. M., Klemme, S. y Timmis, J. N. (2014). Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71:467-478.

Huang, C. R. L., Burns, K. H. y Boeke, J. D. (2012). Active transposition in genomes. *Annual Review of Genetics*, 46:651-675.

Hunziker, A. T. (2001). *Genera solanacearum*. The genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system. A.R.G. Gantner Verlag K.-G., Ruggell.

Jones, R. (1995). B chromosomes in plants. *New Phytologist*, 131:411-434.

Jones, R. N. (1991). B-chromosome drive. *American Naturalist*, 137:430-442.

Jones, R. N. y Rees, H. (1982). *B chromosomes*. Academic Press.

Jones, R. N., Viegas, W. y Houben, A. (2007). A century of B chromosomes in plants: so what?. *Annals of Botany*, 101:767-775.

Kejnovsky, E., Hawkins, J. S. y Feschotte, C. (2012). Plant transposable elements: biology and evolution. In *Plant Genome Diversity*, 1:17-34.

Krishnakumar, K. y Kuriachan, P. (1998). Karyomorphological studies in *Cestrum* (Solanaceae). *The Journal Cytology and Genetics*, 33:121–124.

Kubis, S., Schmidt, T. y Heslop-Harrison, J. S. (1998). Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. *Annals of Botany*, 82:45-55.

Kumar, A. y Bennetzen, J. L. (1999). Plant retrotransposons. *Annual Review of Genetics*, 33:479-532.

Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for

large datasets. *Bioinformatics*, 30:3276-3278.

Las Peñas, M. L., Chiarini F. E., Bernardello G. y Benítez de Rojas C. (2006). Karyotype of some species of *Cestrum*, *Sessea* and *Vestia* (tribe Cestreae, Solanaceae). *Caryologia*, 59:131-137.

Leach, C. R., Houben, A., Field, B., Pistrick, K., Demidov, D. y Timmis, J. N. (2005). Molecular evidence for transcription of genes on a B chromosome in *Crepis capillaris*. *Genetics*, 171:269-278.

Levan, A., Fredga, K. y Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52:201-220.

L'Homme, Y., Seguin, A. y Tremblay, F. M. (2000). Different classes of retrotransposons in coniferous spruce species. *Genome*, 43:1084-1089.

Llorens, C., Futami, R., Covelli, L., Domínguez-Escribá, L., Viu, J. M., Tamarit, D. y Maumus, F. (2010). The *Gypsy* Database (GyDB) of mobile genetic elements: release 2.0. *Nucleic Acids Research*, 39:D70-D74.

Ma, W., Gabriel, T. S., Martis, M. M., Gursinsky, T., Schubert, V., Vrána, J., Dolezel, J., Grundlach, H., Altschmied, L., Scholz, Uwe, Himmelbach, Behrens, S., Banaei-Moghaddam, A. M., Himmelbach, A. y Houben, A. (2016). Rye B chromosomes encode a functional Argonaute-like protein with in vitro slicer activities similar to its A chromosome paralog. *New Phytologist*, 213:916-928.

Macas, J., Meszaros, T. y Nouzova, M. (2002). PlantSat: a specialized database for plant satellite repeats. *Bioinformatics*, 18:28-35.

Makunin, A. I., Kichigin, I. G., Larkin, D. M., O'Brien, P. C., Ferguson-Smith, M. A., Yang, F., Proskuryakova, A. A., Vorobieva, N. V., Chernyaeva, E. N., O'Brien, S. J., Graphodatsky, A. S. y Trifonov, A. A. (2016). Contrasting origin of B chromosomes in two cervids (Siberian roe deer and grey brocket deer) unravelled by chromosome-specific DNA sequencing. *BMC Genomics*, 17:618.

Martis, M. M., Klemme, S., Banaei-Moghaddam, A. M., Blattner, F. R., Macas, J., Schmutzer, T., Scholz, T., Gundlach, H., Wicker, T., Simkova, H., Petr, N.,

Neumann, P., Kubalaková, M., Bauer, E., Haseneyer, G., Fuchs, J., Doležel, J., Stein, N., Mayer, K. F. X. y Houben A. (2012). Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.*, 109:13343–13346.

Miao, V. P., Covert, S. F. y VanEtten, H. D. (1991). A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable (“B”) chromosome. *Science*, 254:1773-1776.

Montero-Castro J. C., Delgado-Salinas, A., De Luna, E. y Eguiarte, L. E. (2006). Phylogenetic Analysis of *Cestrum* Section *Habrothamnus* (Solanaceae) Based on Plastid and Nuclear DNA Sequences. *Systematic Botany*, 31:843-850.

Moscone E. (1992). Estudios sobre cromosomas meióticos en Solanaceae de Argentina. *Darwiniana*, 31: 261-297.

Nur, U. (1969). Mitotic instability leading to an accumulation of B-chromosomes in grasshoppers. *Chromosoma* 27:1-19.

Oinuma, T. (1949). Cytological studies on the genus *Solanum* with special reference to the karyotypes. *Japanese Journal of Genetics*, 24:182-189.

Olmstead R. G., Sweere J. A., Spangler R. E., Bohs L. y Palmer J. D. (1999). Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. In M. Nee, D. E. Symon, R. N. Lester, and J. P. Jessop (eds.), *Solanaceae IV: Advances in biology and utilization*. Royal Botanic Gardens, Kew, U.K., 111-137.

Olmstead, R. G. y Palmer, J. D. (1992). A chloroplast DNA phylogeny of the Solanaceae: subfamilial relationships and character evolution. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 346-360.

Olmstead, R. G., Bohs, L., Migid, H. A., Santiago-Valentin, E., Garcia, V. F. y Collier, S. M. (2008). A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon*, 57:1159-1181.

Palestis, B. G., Trivers, R., Burt, A. y Jones, R. N. (2004). The distribution of B chromosomes across species. *Cytogenetic and Genome Research*, 106:151-158.

Parker, J. S., Jones, G. H., Edgar, L. y Whitehouse, C. (1989). The population cytogenetics of *Crepis capillaris*. II. The stability and inheritance of B-chromosomes.

Heredity, 63:19-27.

Peška, V., Fajkus, P., Fojtová, M., Dvořáčková, M., Hapala, J., Dvořáček, V. y Fajkus, J. (2015). Characterisation of an unusual telomere motif (TTTTTTAGGG) *n* in the plant *Cestrum elegans* (Solanaceae), a species with a large genome. *The Plant Journal*, 82:644-654.

Puertas, M. J. (2002). Nature and evolution of B chromosomes in plants: a non-coding but information-rich part of plant genomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 96:198-205.

Ramos, E., Cardoso, A. L., Brown, J., Marques, D. F., Fantinatti, B. E., Cabral-de-Mello, D. C., Oliveira, R. A., O'Neill, R. y Martins, C. (2016). The repetitive DNA element BncDNA, enriched in the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*, transcribes a potentially noncoding RNA. *Chromosoma*, 126:313-323.

Reeves, A. (2001). MicroMeasure: a new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. *Genome*, 44:439-443.

Romanutti, A. A. y Barboza, G. E. (2013). *Cestrum*. In: Anton A. M. y Zuloaga F. O. (eds), *Flora Argentina*, Vol. 13. IBODA-IMBIV, CONICET, San Isidro, 31-41.

Romanutti, A. A. y Hunziker, A. T. (1998). *Flora fanerogamica Argentina: fascículo 55. 256. Solanaceae, parte 7. Tribu VI. Cestreae*. Córdoba: Proflora, Conicet 14.

Rothfels, K. H. (1950). Chromosome complement, polyploidy and supernumeraries in *Neopodismopsis abdoinalis* (Acrididae). *Journal of Morphology* 87:287-315.

Ruíz-Rejón, M., Ruíz-Rejón, C. y Oliver, J. L. (1987). La evolución de los cromosomas B: existen cromosomas egoístas. *Investigación y Ciencia*, 133:92-101.

Sambrook, J. R. y Russell, D. (2001). *DW. 2001 Molecular cloning: a laboratory manual*. *Quarterly Review of Biology*, 76:348-349.

Särkinen, T., Bohs, L., Olmstead, R. G. y Knapp, S. (2013). A phylogenetic framework for evolutionary study of the nightshades (Solanaceae): a dated 1000-tip tree. *BMC Evolutionary Biology*, 13:214.

Schulman, A. H., Flavell, A. J., Paux, E. y Ellis, T. N. (2012). The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. *Mobile Genetic Elements: Protocols and Genomic Applications*, 115-153.

Schultes, R. E. y Raffauf, R. F. (1991). Phytochemical and ethno pharmacological notes on the Solanaceae of the northwest Amazon. In: *Solanaceae III, taxonomy, chemistry, evolution*. Hawkes, Lester, Nee y Estrada. Royal Botanic Gardens, Kew, 25.

Schwarzacher, T. P., Ambros, P., Schweizer, D. (1980). Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Systematics and Evolution*, 134:293–297.

Schwarzacher, T. y Heslop-Harrison, P. (2000). *Practical in situ Hybridization*. BIOS Scientific Publishers Ltd.

Schweizer, D. (1980). Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 27:190-193.

Sharma A. K. y Sharma A., (1957). Karyotypes studies in *Cestrum* as an aid to taxonomy. *Genetica*, 29:83-100.

Sharma, S., y Raina, S. N. (2005). Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 109:15-26.

Silva, D. M., Pansonato-Alves, J. C., Utsunomia, R., Araya-Jaime, C., Ruiz-Ruano, F. J., Daniel, S. N., Hashimoto, D. T., Olivera, C., Camacho, J. P., Porto-Foresti, F. y Foresti, F. (2014). Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). *PLoS ONE*, 9:e94896.

Stebbins, G. L. (1971). *Chromosomal evolution in higher plants*. Edward Arnold, London

Stiefkens, L. y Bernardello G. (2002). Karyotypic studies in *Lycium* section *Mesocope* (Solanaceae) from South America. *Caryologia*, 55:199-206.

Stiefkens, L. y Bernardello G. (2006). Karyotypic studies in *Lycium* Sect. *Schistocalyx* and *Sclerocarpellum* (Solanaceae). *Edinburgh Journal of Botany*, 62:53-67.

Sykorová, E., Lim K. Y., Fajkus J. y Leitch A. R. (2003)a. The signature of the *Cestrum* genome suggests an evolutionary response to the loss of (TTTAGGG)_n telomeres. *Chromosoma*, 112:164-172.

Sykorová, E., Lim, K. Y., Chase M. W., Knapp S., Leitch I. J., Leitch, A. R. y Jiri Fajkus J. (2003)b. The absence of Arabidopsis-type telomeres in *Cestrum* and closely related genera *Vestia* and *Sessea* (Solanaceae); first evidence from eudicots. *Plant Journal*, 34:283-291.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., y Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30:2725-2729.

Techio, V. H., Mittelmann, A., Marció, S. y Pereira, A. V. (2010). Meiotic and mitotic behaviour of B chromosomes of ryegrass. *Ciência Rural*, 40:83-88.

Tokarskaia, O. N., Efremova, D. A., Kan, N. G., Danilkin, A. A., Sempere, A., Petrosian, V. G. y Ryskov, A. P. (2000). Variability of multilocus DNA markers in populations of the Siberian (*Capreolus pygargus* Pall.) and European (*C. capreolus* L.) roe deer. *Genetika*, 36:1520-1530.

Tschischow, N. D. (1956). Número de cromosomas de algunas plantas chilenas. *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción*, 31:145-147.

Urdampilleta, J. D., de Souza, A. P., Schneider, D. R., Vanzela, A. L., Ferrucci, M. S. y Martins, E. R. (2009). Molecular and cytogenetic characterization of an AT-rich satellite DNA family in *Urvillea chacoensis* Hunz.(Paullinieae, Sapindaceae). *Genetika*, 136:171-177.

Urdampilleta, J.D., Chiarini F., Stiefkens L. y Bernardello G. (2015). Chromosomal differentiation of Tribe Cestreae (Solanaceae) by analyses of 18-5.8-26S and 5S rDNA distribution. *Plant Systematic of Evolution*, 301:1325-1334.

Valente, G. T., Conte, M. A., Fantinatti, B. E., Cabral-de-Mello, D. C., Carvalho, R. F., Vicari, M. R. y Martins, C. (2014). Origin and evolution of B chromosomes in the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata* based on integrated genomic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 31:2061-2072.

Valente, G. T., Nakajima, R. T., Fantinatti, B. E., Marques, D. F., Almeida, R. O., Simões, R. P., y Martins, C. (2016). B chromosomes: from cytogenetics to systems biology. *Chromosoma*, 126:73-81.

Van der Pijl, L. (1982). Principles of dispersal in higher plants. 2 ed, Springer Verlag, Berlin, 214.

Van Sluys, M., Scortecci, K. C. y Costa, A. P. P. (2001). O genoma instável, seqüências genéticas móveis. In: Matioli SR (ed) *Biologia Molecular e Evolução*. Holos Editora, Ribeirão Preto, 70-81.

Vanzela, A. L. L., de Paula, A. A., Quintas, C. C., Fernandes, T., da Cruz Baldissera, J. N. y de Souza, T. B. (2017). *Cestrum strigilatum* (Ruiz y Pavón, 1799) B chromosome shares repetitive DNA sequences with A chromosomes of different *Cestrum* (Linnaeus, 1753) species. *Comparative Bytogenetics*, 11:511.

Via do Pico, G. M., Vega, A. J. y Dematteis, M. (2016). Systematic consideration of floral microcharacters of the South American genus *Chrysolaena* (Vernonieae, Asteraceae). *Systematics and Biodiversity*, 14:224-243.

Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K. y Kahl, G. (2005). DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. CRC press.

Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J. L., Capy, P., Chalhoub, B. y Paux, E. (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics*, 8:973-982.

Yao, J., Xiaoyu, L., Cheng, P., Yeyun, L., Jiayue, J. y Changjun, J. (2017). Cloning and analysis of reverse transcriptases from Ty1-*copia* retrotransposons in *Camellia sinensis*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 31:663-669.

ANEXO 1. Secuencias de ADN repetitivo obtenidas con enzimas de restricción.

>B2

GGATCCTATTGATAAAGAGAAAGAAATGACCACAACAGACGATCTTGTGCCTAT
AGCATTAAAACAAAGTGCTAGAGATAACTTCACGCAGGTTGGAAAAGAGTTGTT
TGCCCTTTTCAACGATGAAAACCTCAGTGAACATTGAAAGCAAACCTTAGACAATTT
TTCTTACTCCCATGATGATATGGTTGGGATCC

>B4

GGATCCCCATGATTCTTCCTAGGTCCTCTGATCTAACACAATGCCAACCTGAC
CCACTGAGGATCTGAGAGTGCCATCAACCACCTGTAGGTTGTCATAAAATTCCC
TTACTTCAATAGGAGCAAAGGTGTTGTGGCCTTCATCCTCAGTGAGTAAGTCAT
CCCATTTTTGTAGCTCCAGCACCTGAAAAGTTCTTGGATCC

>B6

GGATCCCTGAGTGCTGGCACTATTTTGGGATGAGTCTCTAGGTGCTGACACTAT
TTGAGGCTGTGATTGTGGTTCCTGGGTGCTGACACCATTTTGGAACAGATTTCT
GGATCC

>B9

GGATCCTATATGGTTTTGTTTTGCTCATTCTCTTGCTCCTGAGAGGCAGAAGTCT
TAACTGAGAGAAGATAACATTCTCTTCTTGCTTGCTGGTCATCGTAAAGACTAAA
TACCCCTCAGGGTTGGGAACCTCACACCTGGTACAATGACAATATGATTGCA
CCCATATCATGGATCC

>B10

GGATCCTAGGATTATATTAACCTATATTAGGATGATTTGTGCCTTTCCGTCTTTC
GGAGTATGATTGTTATGGGTTGTAACCTGTTGGGTTATGTGCAAACCTTACAATCA
GATTGTCACAACGGAATTTTAAAATTTTGCACACAACCTACATCGGATCC

>B11

GGATCCATTTTGAATTAGACCAAGTCATCATGACCAGATTTGACTTGGACCAATT
CTAAAGCCCAAGTATATTTATAACCGATTTGTCATCTTTGTAAAAAATTTGCAGC
ATACCTATTACTTAAAAACCACACGCGGGATCC

>B12

GGATCCTGGTGCGGTGTTTCGCGCTATAAGTCGGGTGTTTCGCATCGGTTATAT
CCCAGTGTGGTGTGTTTGGATACTGGTGCGGTATATCGCGTTATAAGACGGGC
ATTATCGTCCGCTACACCGCAGGGTTGGTACTTTGTGCCCCGGGATCC

>B14

GGATCCATGCAATGAAGGCAGTTCCTTCAACATATTATCCGGTGGTAAATTCCC
CACACCCTGGGGAATGAATTGCATTGTTTGTGAGCAAACGTCATCCAAGCAGTG
TTACAACCTAACAATCGCTGAGTCAACTAATGGGATCC

>B17

GGATCCCTAGAATAGTTAGGGGCAGAGAAGTTCAGGTGTAAAAATGTCAGTTCT
GAAAAGAAAGAATAATTTTAATAAGGTTCTTGCTGAAAATTCTGAGGTACAGCCA

CTTTTTGAGGTGGAGGGACTTCCACAGGGGCTTGTTTCGTTCAATTTTGTCCCTTA
GGGGATCC

>B20

GGATCCAAGCATTAAAGGATGTGGAGCAAAGCCTAGGCACTAGACTCGGATGCC
TGGTCCATAGTCGAGGATGTAGATCCCCTACCCTCTACAATTTGCTACAGATAA
TCATTGGTGAATATACCTTGGAACCTATCCATGCCTGTAGTTATAGGGGATCC

>30

GGATCCCAATTC-TTGATAGCAACTT-
GATGGTTGATATGGTTGATATCTAAAGGACATTTTTTTGAGAAAAAGATCTTTGA
TATGTCGTTGCTAATGGTTTGCCCTGAAAATGATGTGAATAATGCAAGTGTTTCT
AAGATGGTGGTAGTGGTTTGATCATTTACATGAGCAAATAAAGGTAAGATTGTCA
GCAAAAAGAGGTGAGATGAGGTAGGACCTCTACGAGTAACCTTGATTGGATCC

>104

GGATCCTTTATCTCCATACTTGTTTCATTATTGCAGTTGAGGCCTTCTCAAGATCT
CTTAATGCTTTGCATGCTCATCCTAATTATGTCCCTTATAGTCTCCCTAAATGGA
GCTCTCCTCTTAATCATCTTGATATGATGATTCTATCCTCTTTACTTCGGC
TGATAGGAGGATCC

>103

GGATCCAAAGTAATTGAGGTTATGAAGGGCTTGGGCATAAAGCGAATTACGTCC
TCACCTTATCACCCGCCCGCAAACGGACGAGCCGAAGCCTCCAACAAATTAAT
GCTTAACACGCTGGAAAAGAGGCTAAACCGAAGCAAAGCGGGCACAGTCAGGT
TTCAGATATGCCACACTAGAGAGGGGAAGGATTGGACTTAACAGAGGGCCAGC
GGGAGAAAGCATATGCGAAAATGATAGCACACAAAGCGCAGGTAGAAAGAAAC
TACAACAAAAGGGCGAAACTGCGGGCGTTTAAAGAAGGAGAATATGTACTGGG
GGCTACCAACCCAATAATCAAGGATCC

>7'

GACAAAAGATGAGTTTAAGTCACAAATATTGGTTAATTTGGTGCTAATCATGCAA
ACAACACATCTAGGATGATGCACTCAATGAGATTTTTGAGGCAAATGACCTCAA
TAGGGCCCTAAAGAGCCCTAGATGTCAATTTTGCATTAAGAGTCCCTAATTGGG
CCAACATAATGACTTAAGAGATTTTGGTCTGATTTTGTAGTGAAAGGTGATTCATA
ATCACAACCTTGGCCAGATTTGGCTCCAAAGTTTCATTGAGTACACCAAGGCTTA
GTTACTTAGCCAGATTTTAAGGTCTAAGACCCCAATTGGGCCAAAATAGGCCCA
AAAGGTGTACAAATTGCACCTAAGGTCCCTAATTGGGCCAAGAGGTCACTTACA

>48

CGGAAAGTTGATTGCCTCATTCCACTGTCTCAGTTTCTCCTGTTCCGCTTTCTTT
GTTGTACGACCAGGACCACCACCTCGCCTGGATGAGCCTCCTCGACCCTCCAT
CAACACTAGCATAGGATCAGCCCGAGATTGAGCCCTCGTAGTTTTAGCATGGA
GGTGCGTAAAGCGCCCTAGGAGGGAGACATGCCCGAAGTTATGTGCAACCTCC
TCCTTATAGTTACTGACATTGCCATCCGAAGAAATTTACTCCTTCAAACCTACCA
TAATTTAGGCGTCTGCATCTACTAAGTGTAGATAACATACACGTGTCATAATCAC
TAGACGAAAGGAAATAGGACAAACAACCTCCGTTGACGCAC

>66

TGGTTTCACATTTCAATTTCTTTGAATATGTCTAGATATAAGTTCTCTGGTCTATAT

TTTGGCTTGGCAGGATAGACAGTCGGAAATGGAAACCAATAGCCTCTGCAAGTA
CTACTGTTTCATCAAGCAATAGTGGTCCTGCGGAAAAACCAAAGAAGGCATAAT
GAAAGCTTCTAGATTTAGTCTATCGGCTATCGTAGCCAAGAATCAACCTCCCTA
GAAAGAGGATATGAGTGTCATCCTAGTCTTGGACTCCGTAACCCATTTTGAGCT
GCTTAAAGAAATCTCCTATGATTTGGGTCTACTCCAGATTTCCATCAGGGAGAA
AAAGTTGGTTAATGGAATCTTCATTTGAAAGTGGAG

>67

GATCCAATACATCGTGAAGAGAAGGAAAATTAATACCTGAAGGGTAGAAGCAAA
AGCTCTGCTAGATAATTCCTCCTGCTAAACCTTTGAGGAGAATTTGATCACGT
GGCCCACTAGAGCGTGGAATGGAACAAGAGACTGAGCAGAGGGGATGCCTC
CAAAAATTTATGCCTTAGAAGGAATAACAAAATGATGGGTCCCAGCCATTGTCT
CCACAAGTGTAGCTCTCAAACCAGCGAGATCCAGGATGCTCTTCTGCGGAGCA
GTAGCAATTACCTCCTCAACATATCAGGACAAGGCAGGAAATTCTCAACTCAAG
AGGGTGTCATCCAACCTTGTAGGGGATC

ANEXO 2. Secuencias de ADN de Ty1-*Copia*.

>Ty1-*Copia* CN3

TACGGCGTTTTTGCATGGGGATTTGAATGAAGAAGTTTATATGAAACAACCAGA
AGGGTTTGTATTCCCGGTCAGGAACATAAAGTTTGCAAGCTTCTTAAATCTCTT
TATGGTTTAAAACAAGCTCCAAAGCAGTGGCATGAGAAATTTAGAAATATAATGA
TTTCTAATGGGTATTTGATTAATGGTGGTGATATTTGCATATTTAGTAAATTTCAA
GGAAATTCTAGTGTTCTTATTTGTCTCTACGTTGACGACATGCTA

>Ty1-*Copia* CN4

TACGGCGTTCTTGCACGGGGACCTTGAGGAAGAGGTGTATATGAAGCTTCCTC
CTAGTCTTTCCCTTCCTGCTTCTTCCTCTGATTCTCTGGTTTGCAGGTTGAACAA
GTCTCTCTATGGCCTTCGACAGGCCTCTCGACAATGGTATGCCAAATTGTCTCA
TGCTTTGGCTTCCCGAGGTTACACTGCTTCTTTGAATGATTACTCTCTGTTTTTC
AAAGGGTCTCCTGGTAACATGGTGATTCTTGTTGTCTACGTCGACGACATGCT

>Ty1-*Copia* CN9

TACAGCCTTTTTGCACGGTGACTTGGAGGAGGAAATCTACATGTATCAGCCAGA
TGGATTTAGTGTTGCTGGTAAAGAAAAATGGGTTTGCAAACCTGAACAAATCGTT
GTATGGATTAAGCAATGACCGAGGTTGTGGTACAAACGATTTGATAAATTCAT
GATGGGTCAGAAGTACACAAGAAGCAAATATGATCATTGTGTGTATTTGCGCAA
GCTTCATGATGGATCCTACATCTATTTACTCTTGTACGTCGACGATATGCTA

ANEXO 3. Secuencias de ADN de Ty3-Gypsy.

>Ty3-Gypsy CN5

TAGGATGTGCGTTGACTACAGGAGGCTCAATGAGTAACTGTCAAAAATAAATA
CCTAATCCCAGTTGTAGAGATGAGCTACATGGAGGAGCTAATTGGTTTACTAAG
TTAGACTTGAGGTCAGGGTATCACCAAGTCAGGATGAAAAGTGAAGATGAGTTC
AAGACTGCATTTGGGACCCACCATGGACTATGGCAGTTCAGAGTGATGCATTTT
GGACTGACTAATACACCTACTACCTTTCAGGCTGTGTTTGGCCATCATCTCAGA
AAGTTCATTTTAGTATTCTTTGATGACATTCTAGTTTACAACCAAGACTTTGTGAC
GCACTTAGAACACCTTGAGATAGTCCTAAGGCTGCCTAAGGCTCATCAGTTGTT
TGCCAAGCTCACCAAATGTA

>Ty3-Gypsy CN16

TAAGATGTGTGTTGATTATAGTCAACTCAATAAGGTAACAGTGAAGAATAGGTAT
CCTTTGCCTAGGATTGACGACCTGTTTGATCAGCTTCAGGGAGCTAGATATTTT
TCCAAGATTGATTTAAGGTCGGGTTATCATCAGTTGAAGATTAAGGAGGGGGAC
ATTCCAAAACTGCGTTCAGAAGTACGAGGACTTATGAATTTTTGGTGATGT
CCTTCGGGCTAACAAATGCCCTGCAGCTTTCATGGATTTAATGAATCAAGTATT
CAGGCCTTATTTGGACACTTTTATTATTGTATTCATTGATGATACTGGTGTAGT
AAAAAAGTAGAGGAGATCATGAGGAACACCTCAGTATCACCTTACAAACACTCA
AGGAGCACAAGCTCTTTGCCAACTCTCCAAGTGCA

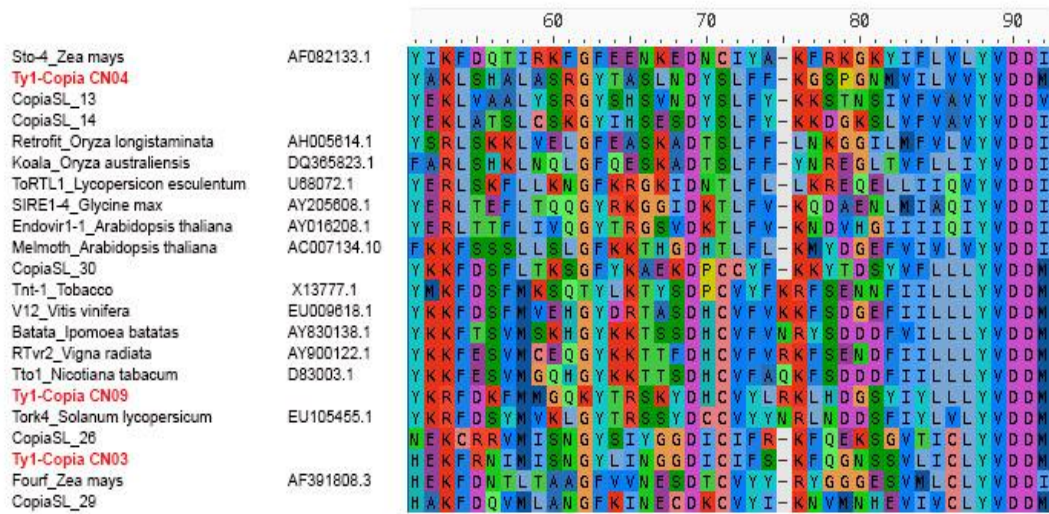
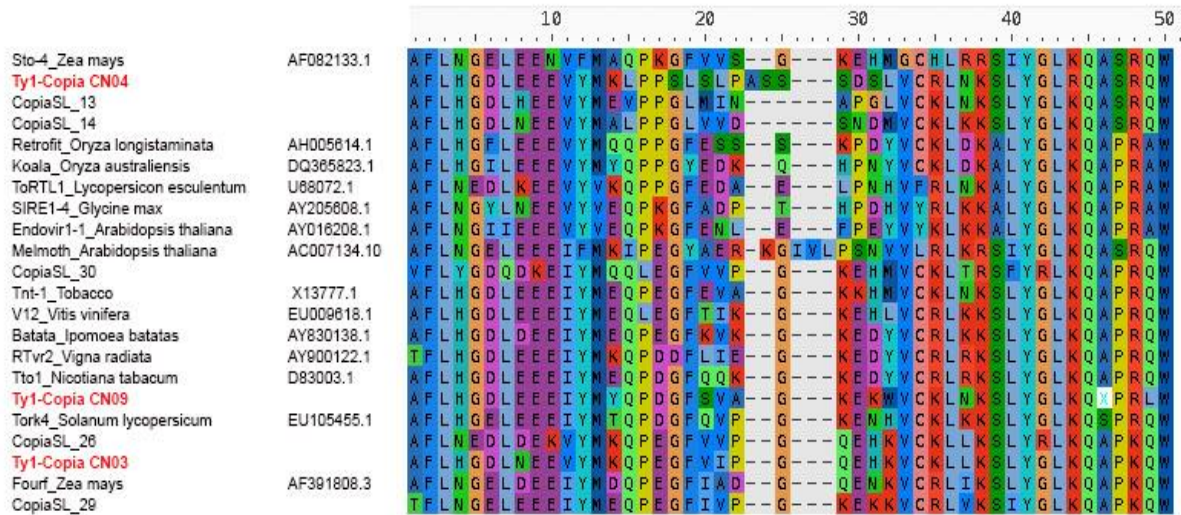
>Ty3-Gypsy CN23

TAGGATGTGTGTGGATTATCGTCAACTCAATAAAGTGACAGTGAAGGACAAGTA
TCCATTACCCAGAATTGACGACTTGTGTTGATCAGCTTCATGGAGCTCGATATTTT
TCCAAGATTGATTTAAGATTGGGTTATCAGCAGTTGAAGATTAAGGAGGGGGAT
ATTCCAAAAACAGCATTGAGGACTAGATACGGGCATTATGAATTTTTGGTAATGTC
TTTCGGGCTAACAAATGCCCGGCAGCTTTCATGGATCTAATGAATCGAGTGTTT
GGGCCTTACTTGGACACCTTTATTATTGTGTTCACTGATGATATTCTGGTATATT
CAAAAAGTAGGGGAGAGCATGAGGAACACCTCAGTATTGCTCTACAAAACTCA
AGGAGCACCAGCTCTTTGCCAACTCACAAAGTGCA

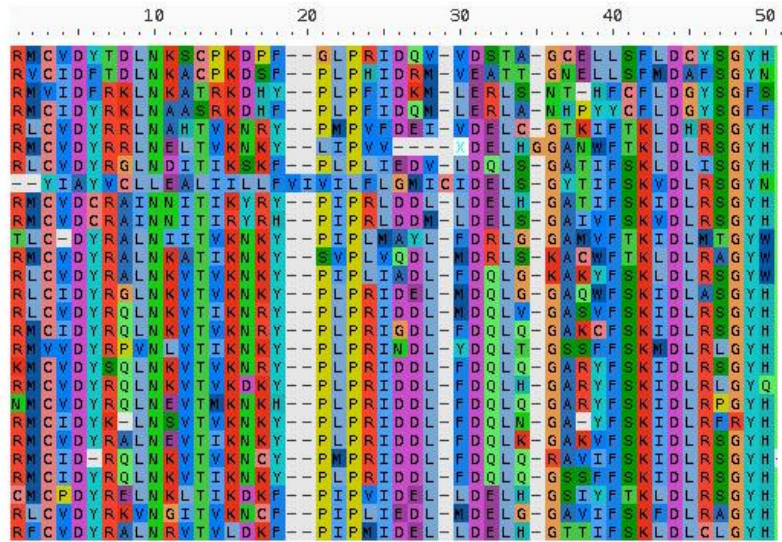
>Ty3-Gypsy CN28

TAACATGTGCGTTGATTACCGTCAACTCAATGAGGTAACCATGAAAAACAAGCA
TCCGCTACCCAGAATTGATGACTTGTGTTGACCAGCTCCAAGGAGCGCGTTATTT
TTCCAAGATTGATTTAAGGCCGGGTTATCATCAGTTGAAGATTAAGGAGGGGGGA
CATTCCAAAAACAGCATTGAGGACTAGATACGGGCATTATGAATTTTTGGTGAT
GTCATTTGGGCTAACAAACGGCCCTGCGGCTTTCATGGATTTAATGAATCGAGT
GTTGAGGCCTTATTTGGACATCTTTATTATTGTATTCATTGATGATATCTTGGTGT
ACTCAAAAAGTAGGGGAGAGCAGGAAGAACACCTCAGTATTGCCTTACAAACAC
TTAAGGAGCACAAGCTCTTTGCCAACTCACCAAATGCA

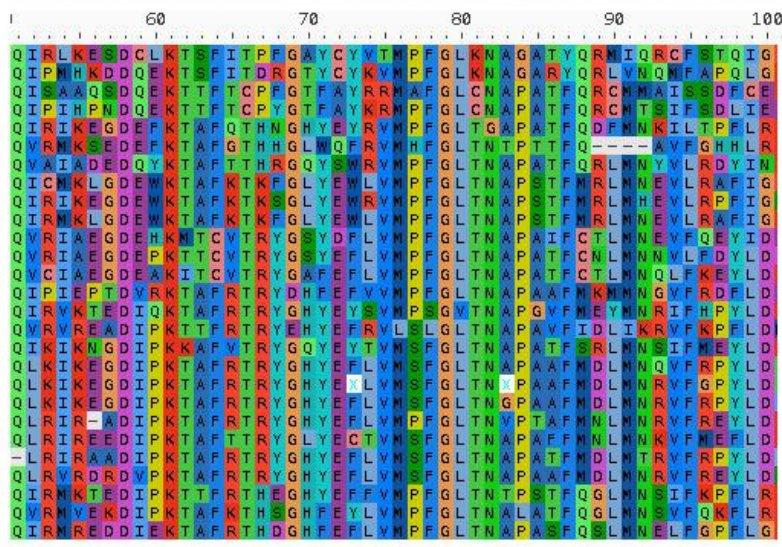
ANEXO 4. Alineamiento de secuencias de aminoácidos con ETs registrados en las bases de datos NCBI y Gydb. A, Ty1-Copia y B, Ty3-Gypsy.



RIRE2_Oryza sativa AB030283.1
 Tat4-1_Arabidopsis thaliana AB005247.2
 Bagy-2_Hordeum vulgare AF254799.1
 Athila4-1_Arabidopsis thaliana AC007209.6
 Reina_Zea mays U69258.1
Ty3-Gypsy CN05
 Tse3_Saccharomyces exiguus AJ439555.1
 Cereba_Hordeum vulgare AF078801.1
 Beetle1_Beta vulgaris AJ539424.1
 CRM_Zea mays AY129008.1
 Tntom1_Nicotiana tomentosiformis AJ508603.1
 Galadriel_Lycopersicon esculentum AF119040.1
 Monkey_Musa acuminata AF143332.1
 Legolas_Arabidopsis thaliana AC006570.6
 Peabody_Pisum sativum AF083074.1
 GypsySL_09
 Bagy-1_Hordeum vulgare Y14573.1
Ty3-Gypsy CN16
Ty3-Gypsy CN23
Ty3-Gypsy CN28
 Del_Lilium henryi X13886.1
 Retrosat-2_Oryza sativa AF111709.1
 GypsySL_07
 GypsySL_05
 Ifg7_Pinus radiata AJ004945.1
 Gimli_Arabidopsis thaliana AL049656.2
 Gloin_Arabidopsis thaliana AC007189.7



RIRE2_Oryza sativa AB030283.1
 Tat4-1_Arabidopsis thaliana AB005247.2
 Bagy-2_Hordeum vulgare AF254799.1
 Athila4-1_Arabidopsis thaliana AC007209.6
 Reina_Zea mays U69258.1
Ty3-Gypsy CN05
 Tse3_Saccharomyces exiguus AJ439555.1
 Cereba_Hordeum vulgare AF078801.1
 Beetle1_Beta vulgaris AJ539424.1
 CRM_Zea mays AY129008.1
 Tntom1_Nicotiana tomentosiformis AJ508603.1
 Galadriel_Lycopersicon esculentum AF119040.1
 Monkey_Musa acuminata AF143332.1
 Legolas_Arabidopsis thaliana AC006570.6
 Peabody_Pisum sativum AF083074.1
 GypsySL_09
 Bagy-1_Hordeum vulgare Y14573.1
Ty3-Gypsy CN16
Ty3-Gypsy CN23
Ty3-Gypsy CN28
 Del_Lilium henryi X13886.1
 Retrosat-2_Oryza sativa AF111709.1
 GypsySL_07
 GypsySL_05
 Ifg7_Pinus radiata AJ004945.1
 Gimli_Arabidopsis thaliana AL049656.2
 Gloin_Arabidopsis thaliana AC007189.7



RIRE2_Oryza sativa AB030283.1
 Tat4-1_Arabidopsis thaliana AB005247.2
 Bagy-2_Hordeum vulgare AF254799.1
 Athila4-1_Arabidopsis thaliana AC007209.6
 Reina_Zea mays U69258.1
Ty3-Gypsy CN05
 Tse3_Saccharomyces exiguus AJ439555.1
 Cereba_Hordeum vulgare AF078801.1
 Beetle1_Beta vulgaris AJ539424.1
 CRM_Zea mays AY129008.1
 Tntom1_Nicotiana tomentosiformis AJ508603.1
 Galadriel_Lycopersicon esculentum AF119040.1
 Monkey_Musa acuminata AF143332.1
 Legolas_Arabidopsis thaliana AC006570.6
 Peabody_Pisum sativum AF083074.1
 GypsySL_09
 Bagy-1_Hordeum vulgare Y14573.1
Ty3-Gypsy CN16
Ty3-Gypsy CN23
Ty3-Gypsy CN28
 Del_Lilium henryi X13886.1
 Retrosat-2_Oryza sativa AF111709.1
 GypsySL_07
 GypsySL_05
 Ifg7_Pinus radiata AJ004945.1
 Gimli_Arabidopsis thaliana AL049656.2
 Gloin_Arabidopsis thaliana AC007189.7

