

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA



CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR CON ISTRs DE LÍNEAS DE
MAÍZ Y SUS HÍBRIDOS, PARA LOS FACTORES DE
INCOMPATIBILIDAD GENÉTICA *Ga1-S* Y *TIC***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO AGRÓNOMO**

PRESENTA:

Ana Paulina Velasco Ramírez

Zapopan, Jalisco, 2007



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERO AGRÓNOMO
COMITE DE TITULACIÓN

DR. SALVADOR MENA MUNGUÍA
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
PRESENTE

Con toda atención nos permitimos hacer de su conocimiento, que habiendo sido aprobada la modalidad de titulación TESIS E INFORMES, opción, TESIS, con el título:

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR CON ISTRs DE LÍNEAS DE MAÍZ Y SUS HÍBRIDOS PARA LOS FACTORES DE INCOMPATIBILIDAD GENÉTICA Ga1-S Y TIC”

El cual fue presentado por él (los) pasante(s):

ANA PAULINA VELASCO RAMÍREZ

El Comité de Titulación, designó como director y asesores, respectivamente, a los profesores:

M.C. MARTHA ISABEL TORRES MORÁN	DIRECTOR
DR. JOSÉ DE JESÚS SÁNCHEZ GONZÁLEZ	ASESOR
DR. LINO DE LA CRUZ LARIOS	ASESOR

Una vez concluido el trabajo de titulación, el Comité de Titulación designó como sinodales a los profesores:

DR. SALVADOR MENA MUNGUÍA	PRESIDENTE
DRA. MARÍA LUISA GARCÍA SAHAGÚN	SECRETARIO
M.C. MARTHA ISABEL TORRES MORÁN	VOCAL

Se hace constar que se han cumplido los requisitos que establece la Ley Orgánica de la Universidad de Guadalajara, en lo referente a la titulación, así como el Reglamento del Comité de Titulación.



ATENTAMENTE

"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan, Jal. a 5 de diciembre de 2007.

M.C. SALVADOR GONZÁLEZ LUNA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

DRA. MARÍA LUISA GARCÍA SAHAGÚN
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

DEDICATORIAS

Dedico el presente trabajo a Dios por permitirme estar aquí y brindarme la fuerza necesaria para derribar todas las barreras que he encontrado en el camino.

A mis padres que me acompañan, me guían y me apoyan en este camino que llevo recorrido; por quererme, orientarme hacia ocupaciones intelectuales y porque se que mi triunfo es compartido en todas sus partes por ustedes.

A mis hermanos, espero esto constituya un estímulo para ustedes.

A mis profesores por enseñarme lo excitante y gozoso de la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que siempre creyeron en mí, por que me han apoyado, y han sido un ejemplo en mi vida.

Un especial y profundo agradecimiento a mi Director, M.C. Martha Isabel Torres Morán, por su paciencia, apoyo, dirección, entrega y amistad.

Al Dr. José de Jesús Sánchez González y al Dr. Lino de la Cruz Larios por su asesoría, observaciones, correcciones adecuadas para enriquecer mi trabajo y la proporción de los materiales.

A la Universidad de Guadalajara, por permitirme obtener las bases de mi profesión.

A mis compañeros Martín Gerardo, Martín y Andrés por su apoyo y participación para la realización de este trabajo.

A Rodrigo, Victoria, Ivonne, Cecilia y demás amigos por su enorme apoyo, cariño y comprensión.

Al Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba y al M.C. Ricardo Nuño Romero por sus grandes consejos dentro de las aulas y por su amistad y apoyo.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Objetivos	4
1.2 Hipótesis.....	5
II. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 Maíz y teocintle	6
2.2 Mejoramiento genético.....	9
2.2.1 Líneas puras e Híbridos.....	10
2.3 Caracterización	11
2.4 Sistemas de compatibilidad del maíz.....	11
2.4.1 Factores de compatibilidad del maíz.....	13
2.4.2 Sistemas de incompatibilidad del maíz	14
2.4.3 Complejo de incompatibilidad del teocintle (TIC)	16
2.5 Tecnología del ADN	18
2.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	19
2.5.2 Marcadores moleculares.....	20
2.5.3 ISTRs (<i>Inverse Sequence-Tagged Repeat</i>).....	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1 Material vegetal	25
3.2 Extracción de ADN genómico.....	25
3.3 Amplificación	26
3.4 Análisis Estadístico	26
IV. RESULTADOS	28
V. CONCLUSIONES	33
VI. LITERATURA CITADA	34
GLOSARIO.....	38
ANEXOS	41
PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	42
PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES	43

RESUMEN

En los estudios realizados en el IMAREFI (Instituto de Manejo y Aprovechamiento de los Recursos Fitogenéticos) sobre factores gametofíticos de incompatibilidad genética en líneas e híbridos de maíz, así como de teocintle como pariente cercano del mismo, se ha recurrido a la caracterización de los materiales en estudio con diferentes marcadores genéticos. El objetivo del presente trabajo fue detectar la posible asociación de un marcador aleatorio del tipo de los ISTR con los factores gametofíticos de incompatibilidad en estudio.

Los factores gametofíticos de incompatibilidad se refiere específicamente a los alelos que se expresan en la generación gametofítica de las plantas. Los factores gametofíticos en maíz son numerosos y han sido reportados en al menos 10 regiones cromosómicas de ocho de los diez cromosomas del maíz (De la Cruz . 2007).

Los ISTRs (Inverse Sequence Tagged Repeat) son marcadores basados en secuencias de retrotransposones que son elementos genéticos que se mueven dentro del genoma de un organismo vía ARN. Existen en la mayoría de las plantas y son secuencias que se auto-repican y reinsertan en diferentes partes del genoma (Rhode, 1996). Los polimorfismos que detectan pueden ser utilizados para construir patrones de comparación útiles en la identificación de variedades y en la caracterización molecular de plantas.

El material vegetal que se utilizó consistió de siete líneas de maíz y dos cruza identificadas en campo como poseedoras de los factores gametofíticos de incompatibilidad *Ga1-S* y *tcb1*. Se obtuvo ADN de cada uno de los materiales y se realizó la amplificación por PCR para ISTR-

Del análisis hecho a la información obtenida, se encontraron agrupaciones diferentes de los materiales, en donde puede identificarse grupos formados por los híbridos y los materiales que los originaron, así como agrupaciones relativas a los orígenes de los mismos.

I. INTRODUCCIÓN

La importancia del maíz en la alimentación mundial es la razón que sustenta que aún hoy en día existan muchas instituciones dedicadas al estudio de sus características y su mejoramiento genético, así mismo los estudios sobre recursos fitogenéticos en nuestro país han tomado gran importancia por la necesidad de preservar para generaciones futuras la diversidad existente y conocer el real potencial que se puede generar del manejo y conservación de los mismos.

La relación estrecha que se ha encontrado entre el maíz y su ancestro, el teocintle, ha generado la necesidad de conocer a fondo el mecanismo de incompatibilidad con el cual interactúan y del cual pueden beneficiarse tanto los programas de mejoramiento genético, de producción de semillas y la preservación de su diversidad genética. El maíz y el teocintle (*Zea spp.*), son especies de polinización cruzada y producen por lo general híbridos fértiles entre sí. La ocurrencia de híbridos entre el maíz y el teocintle está bien documentada y hay evidencias directas en los registros arqueológicos de que el maíz y el teocintle han estado intercambiando genes por mucho tiempo. Sin embargo, varios investigadores han indicado que el flujo genético entre maíz y teocintle es un evento más raro de lo que podría esperarse, y que esto es debido a los mecanismos de incompatibilidad (De la Cruz. 2007).

El flujo genético entre especies y variedades en la naturaleza y en los campos de los agricultores depende de varios mecanismos de aislamiento, incluyendo a) barreras geográficas y distancia, b) sincronía en floración y c) sistemas de incompatibilidad; la incompatibilidad entre especies o variedades es uno de los mecanismos más efectivos que limitan o evitan el flujo genético. Como resultado de varias décadas de estudios de genética, fisiología y aspectos moleculares, se ha logrado un buen entendimiento de los sistemas de auto-incompatibilidad en varias especies de plantas. En contraste, las bases científicas de la incompatibilidad entre plantas de polinización cruzada como el maíz y sus parientes silvestres, están en un nivel muy bajo de entendimiento (Sánchez 2003).

Los factores que previenen la polinización entre especies y variedades del género *Zea*; son conocidos en el ámbito científico como "incompatibilidad gametofítica". Los sistemas de incompatibilidad más conocidos están asociados a los loci *ga1* y *tcb1* que se encuentran predominantemente en los maíces palomeros y en teocintle, respectivamente. La incompatibilidad en las especies del género *Zea* es de gran importancia ya que previene la polinización con base en la acción de varios mecanismos de reconocimiento entre el polen y los pistilos; cuando no existen barreras genéticas, se logra formación completa del grano en las mazorcas, mientras que la existencia de barreras para el cruzamiento causa una falla completa en la formación del grano en todas las mazorcas.

Realizar este tipo de investigación, implica invertir gran esfuerzo ya que se realiza por medio de trabajos de campo donde los investigadores hacen los cruzamientos en forma manual, además del hecho de poder realizarlo solo por dos ciclos de siembra en el año. Es por ello que existe gran necesidad de reducir el tiempo y ahorrar trabajo, apoyándose de métodos como el molecular, que brinda la posibilidad de conocer el contenido genético de sus materiales, mucho antes de que la planta llegue a la madurez, es decir, en caso de los factores gametofíticos, ubicar su presencia con anticipación a la planeación de las cruzas en campo, cuando la planta es aun muy pequeña.

La presente investigación se basa en la capacidad de generar un patrón confiable para la caracterización del material genético estudiado en IMAREFI (Instituto de Manejo y Aprovechamiento de Recursos Fitogenéticos), basado en el marcador molecular llamado ISTR (Inverse sequence Tagged Repeat) que genera una huella con la que se pretende buscar asociaciones a factores específicos y completar la información que es necesaria en el estudio del recurso fitogenético en cuestión.

Por ello, se plantearon los siguientes objetivos para el presente trabajo:

1.1 Objetivos

- Obtener patrones de amplificación con ISTRs que puedan asociarse a los factores de incompatibilidad genética *Ga1-S* y TIC.

- Estandarizar un protocolo molecular, de análisis rápido y sencillo para detectar características genéticas específicas en Maíz.

1.2 Hipótesis

Al menos un marcador ISTRs puede estar asociado a un *factor gametofítico* de incompatibilidad.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Maíz y teocintle

El cultivo del maíz tiene importancia especial, dado que este cereal constituye la base de la alimentación de los latinoamericanos. Su origen no se ha podido establecer con precisión. Sin embargo, se puede afirmar que el maíz ya se cultivaba en América Latina en la época precortesiana.

El maíz ocupa el tercer lugar en la producción mundial después del trigo y el arroz. Se cultiva en una superficie total de 106 millones de hectáreas. Su rendimiento es de 215 millones de toneladas, lo que representa un promedio de dos toneladas por hectárea. Es un cereal que se adapta ampliamente a diversas condiciones ecológicas y edáficas. Por eso, se le cultiva en casi todo el mundo. Es una buena fuente de almidón, pero su contenido de proteínas es más bajo que el de otros cereales. Entre las clases de maíz, el amarillo es el más nutritivo, por su alto contenido de vitamina B. El maíz opaco tiene un alto contenido de lisina, que es un aminoácido esencial. Tiene también importancia en la alimentación animal, tanto por su forraje como por sus granos enteros, molidos o quebrados, que son sumamente nutritivos. Desempeña un papel importante en la industria ya que se procesa en gran número de productos y subproductos, como aceite, colodión, celuloide, explosivos, plásticos, jabón, glicerina, emulsiones, productos medicinales y productos farmacéuticos (SEP, 2001).

La importancia del maíz en la alimentación mundial es la razón que sustenta que aún hoy en día existan muchas instituciones dedicadas al estudio de sus características y su mejoramiento genético.

La recolección y preservación de las razas y variedades nativas del maíz es una tarea urgente para preservar y desarrollar la fuente de genes útiles para el mejoramiento genético y la conservación del recurso filogenético (De la Cruz, 2007).

Por lo tanto el maíz se ha convertido, no sólo en México sino en buena parte del mundo, en sustento permanente de múltiples grupos campesinos, en el alimento barato de millones de trabajadores asalariados urbanos y en materia prima estratégica de la ganadería mundial y la industria de alimentos. Pero por sus versátiles cualidades también podría ser una eficiente base material para organizar una producción libre de explotación y despojo (INFROAGRO, 2006).

Después de casi un siglo de estudios en el área de Genética, Citología, Botánica, Arqueología, Ecogeografía e Historia y análisis detallados de genética molecular, la hipótesis de que el teocintle es el ancestro silvestre del maíz se ha aceptado ampliamente en la última década. La domesticación del maíz ocurrió en México hace aproximadamente 10,000 años; evolutivamente el maíz es considerado como el descendiente domesticado de una especie tropical de teocintle anual, *Zea mays* ssp. *parviglumis* (Matzuoka *et al.*, 2002; Doebley, 2004). Aún cuando existen diferencias morfológicas muy marcadas entre el maíz y el teocintle, las diferentes especies, son muy cercanas genéticamente; la hibridación es posible entre todas ellas y los híbridos son completamente fértiles. La herencia entre los caracteres que distinguen el maíz y al teocintle se ha estudiado con gran detalle por Doebley y colaboradores por casi dos décadas. Varios de los caracteres morfológicos estudiados están bajo el control de muchos genes que exhiben herencia cuantitativa; se han identificado cinco o seis regiones en el genoma las cuales tienen una gran influencia en las diferencias observadas (Doebley, 2004).

Al teocintle, considerado el pariente más cercano del maíz, se le ha atribuido una gran importancia en el incremento de la variabilidad y la formación de las principales razas de maíz en México; debido entre otras cosas al sistema de reproducción que permite la hibridación natural en ambos sentidos permitiendo un constante flujo de genes. Se ha descrito cuatro razas de teocintle para México (Nobogame, Mesa Central, Chalco y Balsas) y dos para Guatemala (Guatemala y Huehuetenango). Con base en los trabajos de Doebley, el género *Zea* se divide en dos secciones: 1) La sección *Luxuriantes* incluye *Zea perennis* (Hitch.) 2) La sección *Zea* incluye *Zea mays* L. dividida en: *Zea mays* ssp. *mexicana* (Schrader) Ittis para las razas Chalco, Mesa

Central y Nobogame; *Zea mays* ssp. *parviglumis* que incluye a la raza de teocintle Balsas, *Zea mays* ssp. *Mays* que incluye al maíz cultivado.

Sánchez (1996) menciona que posteriormente, hubo otros trabajos enfocados al uso del teocintle en el mejoramiento genético del maíz; sobresalen los que se refieren a la transferencia de genes de resistencia a sequía y Calor; así como los de estudios del efecto del germoplasma de teocintle en relación con la aptitud combinatoria y la heterosis en caracteres cuantitativos. Algunas de las conclusiones más sobresalientes de tales trabajos fueron: 1) Se demostró que en algunos segmentos cromosómicos provenientes del teocintle contribuyen de manera significativa en el incremento del rendimiento y la heterosis en maíz; 2) la posibilidad de éxito en el mejoramiento de líneas de maíz depende de los antecedentes de esas líneas de maíz por mejorar, las fuentes de teocintle utilizadas y de la proporción de germoplasma incorporado en las líneas de maíz.

Además de la importancia del teocintle en la evolución y mejoramiento del maíz, se le ha considerado desde el siglo pasado, como una especie de gran potencial forrajero en la alimentación animal para las regiones tropicales y subtropicales en base a estudios de calidad y potencial de rendimiento y a sus mecanismos primitivos de dispersión y establecimiento (Rodríguez, 2006).

La distribución del teocintle en México se extiende desde la porción sur de la región cultural conocida como Aridamérica, en la Sierra Madre Occidental del estado de Chihuahua y Valle de Guadiana en Durango, hasta la frontera con Guatemala incluyendo prácticamente toda la porción occidental de Mesoamérica. En las diferentes regiones de México existen poblaciones de teocintle con características morfológicas y genéticas que permiten su diferenciación. Un aspecto que cabe resaltar en relación con la distribución geográfica de teocintle, es que las poblaciones no tienen una distribución uniforme, sino que hay condiciones específicas de clima, suelo e influencia humana, donde es posible localizarlas (Sánchez, 1996).

2.2 Mejoramiento genético

La mejora genética vegetal se puede definir como “la ciencia cuyo objetivo es cambiar el genotipo, mejorándolo para un determinado medio y según el aprovechamiento para el que se vaya a destinar de acuerdo con las necesidades del hombre” (Márquez, 1988).

Otras definiciones la definen como: “el arte y la ciencia de mejorar el genotipo de las plantas en relación con su utilización económica” y “la utilización de un sistema organizado de manipulación genética para modificar una especie vegetal, con el fin de hacerla mas útil o aceptable para un uso específico”.

La mejora genética vegetal es esencialmente una elección de las mejores plantas escogidas dentro de una población en la cual exista variabilidad. En otras palabras, la selección es posible gracias a la existencia de variabilidad (Ruiz, 2002).

A partir de todas estas definiciones, se pueden establecer las tres premisas más importantes para el planteamiento de cualquier programa de mejora genética vegetal:

1. La existencia de variabilidad o bien la capacidad para crearla se convierte de esta forma en el primer requisito de todo programa de mejora.
2. La capacidad de detectar dicha variabilidad, o lo que es lo mismo, la habilidad del mejorador para observar las diferencias que puedan tener valor económico entre plantas de las misma especie y/o la existencia de técnicas capaces de medirlas.
3. La capacidad para manipular dicha variación para producir un nuevo cultivar estable.

En cualquier programa de mejoramiento vegetal, debe tomarse en cuenta primeramente el tipo de planta que se debe someter al programa; y si ésta es alógama o autógama.

Se definen a las plantas alógamas como “una comunidad reproductiva de organismos de fecundación cruzada y reproducción sexual que comparten un mismo conjunto de genes”. Los principios relativos a la herencia ya establecidos tomando la base de Mendel, Morgan y otros hombres de ciencia, permiten conocer la manera de transmisión de los caracteres de un individuo de un par de progenitores a sus descendientes, incluso de varias generaciones (Ruiz, 2002).

2.2.1 Líneas puras e Híbridos

El maíz como especie ha sufrido una evolución increíble desde su descubrimiento como planta autóctona en los altiplanos mexicanos hasta nuestros días.

Una línea pura es una raza homocigótica en todos los loci, obtenida generalmente por sucesivas autofecundaciones en la mejora genética de las plantas.

La primera gran revolución se consiguió con la aparición de los híbridos en 1908, al cruzar dos líneas puras obtenidas por autofecundación. Desde entonces y hasta nuestros días la mejora genética ha conseguido:

- Creación de poblaciones y líneas puras.
- Mejora de las mismas.
- Creación de poblaciones compuestas y sintéticas.
- Retro-cruzamientos.
- Selección genética y/o convergente.

Un híbrido es la cruce entre dos líneas puras y para la obtención de híbridos de maíz es preciso partir de líneas puras, obtenidas por retrocruzamientos (con ella misma hasta alcanzar la homocigosis).

Una vez obtenidas estas líneas, generalmente con una depresión de vigor producida por los retrocruzamientos, se cruzan con otras líneas puras

(obtenidas de la misma manera), y el resultado es un híbrido. Este híbrido goza de lo que se conoce como “vigor híbrido” y consiste en un gran aumento del vigor gracias a la heterocigosis (De la Cruz, 2006)

2.3 Caracterización

La caracterización de germoplasma, consiste en registrar aquellas características cualitativas y cuantitativas que son altamente heredadas y que pueden ser fácilmente observadas así como expresadas en la mayoría de los ambientes. Caracterización es la toma de datos, mayormente cualitativos para describir y diferenciar accesiones de una misma especie. La caracterización sistemática, permite conocer la variación dentro de las colecciones y seleccionar los genotipos más aptos según el fin con el que se estén caracterizando. En general, la caracterización bajo diferentes condiciones ambientales, busca propósitos más específicos, como rendimiento, resistencia a enfermedades y sequía; mientras que la caracterización sistemática (en un solo ambiente) busca propósitos múltiples como características taxonómicas y agronómicas. La caracterización tiene por objetivo la toma de datos de diferente índole (agronómicos, fisiológicos, morfológicos, genéticos, bioquímicos, etc.) con el fin de describir y diferenciar las poblaciones de una misma especie o en algunos casos de diferentes especies. Para la mayoría de los cultivos de importancia económica, el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI, antes IBPGR) ha elaborado guías de descriptores, sin embargo para algunas especies, sobre todo silvestres, aún no están disponibles, por lo que es necesario establecer las características que pueden ser útiles para su clasificación (Sánchez *et al.*, 1996).

2.4 Sistemas de compatibilidad del maíz

Las plantas de polinización cruzada regulan el cruzamiento con el fin de equilibrar los efectos depresores de la endogamia y los efectos disgenésicos de

la hibridación amplia. Se evita la endogamia por medios tales como la separación de los sexos y las diferencias en la época de floración. La autoincompatibilidad fisiológica es especialmente importante en algunos grupos taxonómicos. Como resultado del análisis genético refinado, los estudios fisiológicos extensos y la aplicación de las técnicas modernas de la biología molecular, está emergiendo un conocimiento detallado de la autoincompatibilidad. En el otro extremo del espectro de los tipos de cruzamiento, la hibridación indiscriminada se impide mediante una combinación de factores espaciales, temporales y fisiológicos. En contraste con la autoincompatibilidad, no se conoce bien la base fisiológica de la compatibilidad cruzada. En este caso, el análisis por lo general abarca la complejidad genética de los híbridos interespecíficos. Esta complicación se reduce en cierta medida en *Zea mays*, donde existen diversas incompatibilidades entre las subespecies y dentro de una misma subespecie.

La incompatibilidad cruzada en un caso dado puede ser vista en una de dos formas. La relación congruente normal entre el polen y el pistilo puede estar alterada porque falta alguna función de uno de esos dos miembros. En este caso la fecundación fracasa a causa de que la reacción es incompleta, es decir a causa de la incongruencia (Hogenboom, 1973, Citado por Kermicle y Allen 1990). La otra posibilidad es que existan genes que funcionan específicamente para reconocer el origen externo del polen y sirvan para bloquear una reacción que, de otro modo, sería compatible. Esas funciones de los genes, como las que gobiernan la autocompatibilidad, parecen superponerse a la relación compatible normal. Es probable que ambos mecanismos contribuyan a impedir la incompatibilidad cruzada en forma colectiva y no intentaremos distinguirlos aquí.

La evidencia de la incompatibilidad es de dos tipos: en un cruzamiento dado, tal vez no se forme ninguna semilla a pesar del empleo de polen viable en estigmas en potencia receptivos. La barrera para el cruzamiento es completa. En otros cruzamientos, se puede obtener una formación parcial o completa de semillas, pero la proporción de genotipos de esperma utilizados en la fecundación no es la misma que la que está presente en el polen viable. Algunos granos de polen con ciertos genotipos pueden ser incapaces de

funcionar en determinados pistilos, o ser excluidos por la competencia con el polen de otros genotipos. La compatibilidad parcial se detecta en forma operativa por el crecimiento diferencial del tubo polínico y la distorsión de la recuperación de alelos acoplados a los genes de la incompatibilidad. La compatibilidad parcial puede ser simulada en cruzamientos controlados usando mezclas de polen. Se ha observado la incompatibilidad tanto completa como parcial en *Zea mays* (Kermicle y Allen 1990).

2.4.1 Factores de compatibilidad del maíz

Durante la última década ha existido un interés creciente para entender los diferentes factores involucrados en el flujo genético entre especies y poblaciones de plantas. Hay al menos tres aspectos que han motivado el interés en los estudios del flujo genético en México 1) la posible incorporación del maíz transgénico a la producción agrícola nacional, 2) el mantenimiento de la pureza varietal en la producción de semilla para siembra y 3) la producción comercial de variedades de maíz de usos especiales libres de contaminación por variedades diferentes (Casas *et al.*, 2001).

La limitada información disponible acerca de los factores gametofíticos en los grupos taxonómicos del teocintle se deriva de los intentos de cruzamientos con *Zea mays* ssp. *mays*. Los teocintles diploides en general polinizan con éxito a los maíces dentados estadounidenses. Los cruzamientos en la dirección recíproca son menos controlables y a menudo fracasan. Se ha practicado la polinización de seis colecciones de teocintle mexicano diploide con la variedad de maíz cristalino "Wilbur" (*ga1 ga1*). En las plantas de cuatro de las seis colecciones la formación de semillas fue deficiente o no se produjo. En el proceso de introducir el citoplasma de teocintle en el maíz mediante el retrocruzamiento, se polinizaron seis colecciones de la subespecie *mexicana* y seis colecciones de la subespecie *parviglumis* con las líneas endogámicas estadounidenses W22 y W23, ambas *ga1 ga1*. Los cruzamientos en la mayoría de las plantas de las colecciones de *parviglumis* fueron fructíferos. Cinco de los seis cruzamientos con mexicana produjeron muy poca o ninguna semilla. En

dos casos se introdujo la barrera en la línea endogámica W22 mediante la selección repetida para obtener la no receptividad (Kermicle y Allen, 1990).

Las dos líneas que contienen la barrera descienden de las colecciones clasificadas como razas Chalco y Mesa Central. En la línea retrocruzada la barrera derivada de Chalco fue heredada en forma monogénica. Según los criterios de cruzabilidad con líneas *Ga1-s Ga1-s* establecidas, la distorsión de las proporciones de *su1* en la F2 y el alelismo, se comportó como *Ga1-s*. La barrera extraída de la colección de la raza Mesa Central se comportó en forma diferente. Esta línea polinizó con éxito líneas probadoras *Ga1-s* y *ga1*, pero rechazó el polen de ambas. En *Ga1*, tenía un alelo que le permitió polinizar *Ga1-s Ga1-s*. Cuando está presente sólo, este alelo *Ga1* no causa el rechazo del polen *ga1*. Un alelo de ese tipo, que tiene el polen pero no el potencial de estigmas de *Ga1-s*, fue identificado anteriormente en una línea endogámica derivada del maíz reventador arrocillo blanco. El factor o los factores que confieren la especificidad a la barrera que tiene el teocintle Mesa Central se localizan en un locus que se encuentra a una distancia de cuatro unidades de mapa de *sugary1* en el cromosoma 4. Designamos *gat* a este locus. En conjunción con *ga1*, la barrera conferida por las plantas *Gat gat* es débil, y la de las plantas *Gat Gat* es sólo moderadamente fuerte. No obstante, en combinación con el alelo único de *ga1* presente en la raza Mesa Central, la barrera es fuerte, aun en las plantas heterocigotos. El empleo de mezclas de polen revela una relación funcional entre los alelos *ga1* y *gat*. El polen portador de *Gat* es preferido al que tiene *gat* en los estigmas *Ga1-s ga1*; asimismo, el polen *Ga1-s* es preferido al *ga1* en los estigmas que tienen una barrera *Gat*. (Kermicle y Allen. 1990).

2.4.2 Sistemas de incompatibilidad del maíz

El libro *The Maize Handbook*, escrito por Nelson (Citado por, De la Cruz, 2007) presentó un reporte muy completo de los factores de incompatibilidad en maíz, en dicho trabajo esos factores se refirieron colectivamente como factores

gametofíticos, que en maíz es utilizado para referirse específicamente a los alelos que se expresan en la generación gametofítica.

Los factores de incompatibilidad son numerosos en maíz y se han reportado desde principios del siglo XX en maíz palomero blanco tipo arrocillo (White Rice Popcorn). Se informó acerca del fracaso de la formación de semillas en una variedad de maíz reventador cuando se polinizó con una variedad de maíz dentado. El cruzamiento recíproco tuvo éxito. Como la barrera era unilateral, se podían producir híbridos y progenies de generaciones avanzadas y analizar como carácter heredable la no receptibilidad de la variedad de maíz reventador. La diferencia entre la condición de receptivo y la de no receptivo resultó monogénica y fue mapeado el locus Gametofito-1. El alelo del maíz reventador (*Ga1-s*) es parcialmente dominante ya que los estigmas *Ga1-s Ga1-s* son en general no receptivos al polen (dentado) *ga1*, mientras que los estigmas *Ga1-s ga1-s* son parcialmente receptivos. El sistema *Ga1-s*: *ga1* es formalmente análogo a los genes responsables de las barreras interespecíficas que han sido definidas en varios géneros. La no receptividad de *Ga1-s Ga1-s* al polen *ga* es un criterio útil al examinar las variedades para detectar la presencia del alelo *Ga1*. Así, la mayoría de los maíces reventadores resultaron *Ga1 Ga1*. Todos los dentados y cristalinos norteamericanos ensayados eran *ga1 ga1*, mientras que muchas razas mexicanas y centroamericanas tenían el alelo *Ga1*. Antes, se había identificado a *ga1* como un sitio en el cromosoma 4 del maíz que mostraba una transmisión preferencial de polen en ciertos cruzamientos. Cuando se autopolinizó el híbrido F1 entre el maíz reventador arrocillo y una estirpe *sugary-1*, o se usó al maíz reventador arrocillo como progenitor del polen en retrocruzamientos, se transmitió una región en el cromosoma 4, descendiente de la variedad de maíz reventador (*Ga1*), con la virtual exclusión de la correspondiente región de la variedad dulce (*ga1*). A causa del ligamiento entre *su1* y *ga1*, se presentaron granos del fenotipo dulce en alrededor del 16% (en lugar del 25%) de la progenie F2. Se observó la segregación 50:50 normal cuando el progenitor dulce fue polinizado con la F1. Como se observa distorsión sólo en los estigmas portadores de *Ga1*, evidentemente el reconocimiento entre el polen y los estigmas es un aspecto de este fenómeno. Se han señalado factores de

reconocimiento similares entre el polen y los estigmas en los cromosomas de maíz 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 9. Sin embargo, sólo en el caso de *Ga1* el homocigoto *Ga/Ga* impide la formación de semillas cuando *ga* es la única fuente de polen (Kermicle, 1991)

Según Rodríguez (2006), en un estudio anterior, se describió una prueba general para determinar la presencia de esos factores (gametofíticos) de preferencia del polen. Se registraron los resultados de mezclar polen de estirpes probadoras, cada una de ellas homocigótica para un carácter recesivo del grano, y aplicar la mezcla a los dos progenitores donadores. El empleo de distintos caracteres recesivos en los dos progenitores permitió determinar las proporciones de semillas autofecundadas y cruzadas. Comparando las proporciones relativas de granos de progenies autofecundadas y cruzadas en los dos casos, Jones pudo inferir si el polen autofecundado o cruzado tenía una ventaja comparativa. Casi siempre, y a veces en un grado considerable, el polen autofecundado tenía una ventaja comparativa. Mientras que los efectos de distorsión de la segregación de los genes vinculados a un factor gametofítico prueban únicamente una sola región cromosómica, el diseño de Jones es global pues permite determinar la existencia de esos factores en todo el genoma.

Recientemente se han usado la formación reducida de semillas conjuntamente con una forma modificada de la técnica de Jones de la mezcla de polen para estudiar la interacción entre los factores *Ga*. El polen que confiere color a la aleurona, proveniente de una estirpe que no tiene factores *Ga* conocidos, se mezcla con una estirpe incolora que tiene un determinado alelo *Ga*, y se coloca la mezcla sobre estirpes incoloras con diversas composiciones *Ga* (De la Cruz, 2007).

2.4.3 Complejo de incompatibilidad del teocintle (TIC)

De acuerdo a lo reportado por Kermicle y Evans (2001), los híbridos entre maíz y teocintle siempre han sido posibles. Aplicando polen de teocintle en jilotes de maíz, se tiene como resultado en los híbridos y en la F2, progenies

vigorosas y altamente fértiles. Sin embargo, la ocurrencia de los híbridos, de generaciones F2 y retrocruzas en forma natural en los campos donde el teocintle es endémico, no es común. Algunas poblaciones se encuentran aisladas, espacialmente o por diferencias de floración con las variedades locales de maíz, lo cual limita la oportunidad de que exista polinización cruzada entre ellas y curiosamente, son todavía menos comunes los híbridos en poblaciones que crecen como malezas entre los maíces en donde la floración de ambos es más o menos sincrónica. Debido a este hecho, se ha propuesto la existencia de un complejo de incompatibilidad fisiológica (IC) que puede estar operando en estas circunstancias, basado en analogía al sistema *Ga1-s:ga1* que es polimórfico dentro del maíz.

En el sistema *Ga1-s:ga1* el crecimiento del tubo polínico *ga1* es retardado o detenido en los jilotes *Ga1-s* si *Ga1-s* es homocigótico, la cruzada falla, si es heterocigoto, el éxito del cruzamiento es variable. Cuando jilotes *Ga1-s* son polinizados por mezcla de polen *Ga1-s* y *ga1*, la fertilización se realiza por exclusión del efecto *ga1*. En contraste, se encuentran efectos Mendelianos en progenie de cruza recíprocas y llenados completos cuando jilotes de *ga1/ga1* son polinizados con *Ga1-s/ga1* o *Ga1-s/Ga1*. Tal barrera unidireccional se ha encontrado en ocasiones cuando especies auto-incompatibles son polinizadas con parientes de especies auto-compatibles. La existencia del complejo fisiológico de incompatibilidad (IC) entre teocintle y maíz fue indicado después de intentar hibridaciones usando teocintle como hembra y maíz como macho, esto es, en dirección opuesta a las cruza que son regularmente exitosas. Se obtuvo una buena cantidad de semillas sólo con efectivas introducciones de teocintle, generalmente aquellas que crecían en forma silvestre, más que en las que se presentaban como malezas. Se transfirieron de teocintle a maíz, barreras de dos colecciones de teocintle, "Chalco" y "Central Plateau" usando cruza secuenciadas, aprovechando la ventaja del hecho que son barreras unidireccionales y de herencia simple (Kermicle y Allen 1990).

Las dos barreras probaron tener diferentes bases genéticas. La derivada del teocintle de Chalco no fue diferente del sistema *Ga1-s:ga1* del maíz. En contraste, la de "Central Plateau" trasmite la barrera a su progenie ligada en el

cromosoma 4 y eso es designado como Teocinte Incompatibility Complex (TIC) o complejo de incompatibilidad del teocintle. Un componente de del TIC es el alelo específico de polen *ga1*. El polen que contiene este complejo, fertiliza las plantas *Ga1-s / Ga1-s* del mismo modo eficiente que *Ga1-s*. Pero las plantas que contiene el alelo *Ga1-m* no discriminan entre el polen *Ga1-s* y *ga1*.

En resumen, (Kermicle *et al.*, 2001) reportan que el Teocinte crossing barrier 1 (*Tcb1*) o barrera de cruzamiento del teocintle, es un gene o grupo de genes que restringen el posibilidad de cruzamiento. Este complejo de genes están ligados al locus de gametophyte-1 con sus alelos *Ga1-s*, presentes en muchos maíces y que confieren no-receptividad al polen de otras variedades de maíz. El complejo completo *Tcb-1* (con modificadores positivos presentes) no es receptivo a polen *Ga1-s* lo mismo que a *ga1*; el complejo *Tcb1* atenuado (sin modificadores presentes) se detectó más receptivo a polen *Ga1-s* que a *ga1* lo que sugieren que se debe a cruzamiento entre los dos sistemas de incompatibilidad.

2.5 Tecnología del ADN

Para la aplicación de tecnología de ADN en apoyo a la investigación, deben considerarse los principios en los que ésta se basa. El inicio de la aplicación de esta tecnología, es la extracción de ADN que puede ser genómico (todo el contenido de la célula) o bien de organelos particulares según el estudio que se vaya a realizar. Esto es, ADN mitocondrial (mtADN), ADN de cloroplasto (chADN) o ADN ribosomal (rADN).

Las técnicas que actualmente han sido desarrolladas para la manipulación del contenido genético de un organismo, van desde la aplicación de diferentes métodos para aislar la molécula que contiene esa información (ADN) hasta la construcción de mapas genómicos y la ingeniería genética que permite la "construcción" de organismos transgénicos.

Es importante mencionar, que una de las técnicas más importantes en la tecnología del ADN, es la Reacción en cadena de la polimerasa, conocida por

sus siglas PCR que provienen del inglés Polimerase Chain Reaction, en la que se basan muchos de los marcadores moleculares que se utilizan en la actualidad.

Un esquema que ilustra los pasos principales que se realizan hasta la aplicación de la técnica de la PCR, se muestra en la siguiente figura:

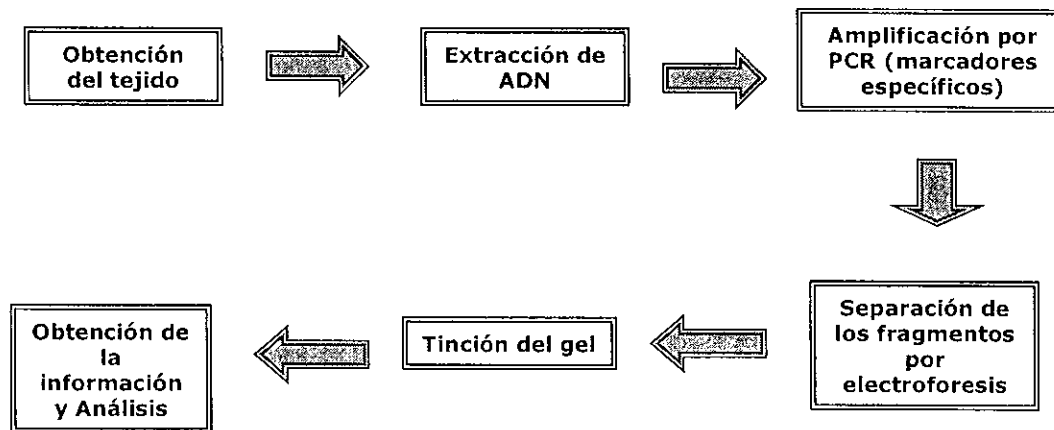


Figura 1. Esquema de la aplicación de marcadores moleculares

2.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método extremadamente poderoso que permite la amplificación selectiva *in vitro* de secuencias específicas del ADN objetivo a partir de una fuente heterogénea y grande como el ADN genómico.

A fin de tener la capacidad de seleccionar una secuencia objetivo particular de una mezcla de secuencias, debe estar disponible la información de las secuencias específicas. Esta información es usada para sintetizar oligonucleótidos cortos (iniciadores, típicamente de 20-25 nucleótidos) que inicialmente se unen a las secuencias complementarias en una reacción de hibridación molecular. Los fragmentos que se amplifican parten de cebadores que amplifican en dirección 5' – 3' en cada una de las cadenas del ADN en estudio, lo que implica que según el marcador que se utilice, algunos incluyen

secuencias diferentes Forward (hacia delante) en una de las cadenas y Reverse (en la otra cadena).

Al inicio de los procesos todos los moldes o templados de la reacción deben ser de cadena sencilla, lo cual se lleva a cabo por desnaturalización con calor. La mezcla de reacción debe contener el ADN objetivo, los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPS): dATP, dCTP, dGTP, y dTTP. Se adiciona la ADN polimerasa la cual sintetiza una cadena complementaria por incorporar los dNTPs de acuerdo a la información de la secuencia dada por la cadena templado o molde. La especificidad de las reacciones de PCR deriva del hecho de que la polimerasa es incapaz de iniciar una nueva cadena complementaria, solamente puede extender la secuencia de iniciadores. Subsecuentemente, la molécula recién formada de ADN de doble cadena es calentada para desnaturalización y puede entonces servir como templado en un nuevo ciclo de síntesis de ADN. Cada ciclo consiste de tres pasos: 1) Desnaturalización del templado, 2) Alineamiento de los iniciadores por complementariedad de bases y 3) Elongación de los iniciadores por la ADN polimerasa. Durante cada paso, la temperatura y duración de la reacción debe ser controlada cuidadosamente, lo cual es mejor realizado en un equipo automatizado. El resultado final es que solamente se sintetiza la secuencia de ADN localizada entre los dos iniciadores. Después de aproximadamente 30 ciclos, esta secuencia de ADN es teóricamente amplificada un billón de veces (Morán y López, 2006).

2.5.2 Marcadores moleculares

Un marcador es un carácter de determinación sencilla empleado en los programas de mejora cuando el carácter de interés que desea seleccionar posee una determinación complicada. Los atributos ideales de un marcador son: a) polimorfismo; b) herencia mendeliana y no epistasia; c) insensibilidad a la influencia y efectos ambientales; d) ausencia de efectos en el desarrollo de la planta, es decir, comportamiento como un gen neutro; e) simplicidad en la

identificación y análisis; f) codominancia; y g) posibilidad de detección en las primeras fases del desarrollo de la planta (Valadez y Kahl 2005).

Los primeros marcadores que se emplearon fueron aquellos que afectaban a la morfología de las plantas. Estos marcadores generalmente son debidos a la mutación de un gen que provoca un fenotipo marcadamente diferente al fenotipo normal. Su empleo es limitado debido a su escasez y a que suelen presentar dominancia, pleiotropia, epistasia e incluso algunos son deletéreos. El desarrollo de los marcadores moleculares ha supuesto un importante avance a la mejora de las plantas. Los marcadores moleculares presentan una serie de ventajas frente a los marcadores morfológicos: se encuentran en cualquier especie; se detectan en estadios tempranos del desarrollo y en cualquier tipo de tejido; su análisis no depende de las condiciones experimentales; son fenotípicamente neutros; y además, la interacción entre ellos es pequeña o nula (ausencia de epistasia) (Sambrook, 2001).

Los marcadores moleculares presentan múltiples aplicaciones en la mejora genética de las plantas. Previamente hay que plantearse que tipo de marcador es el más apropiado a nuestras necesidades y para ello se necesita plantear una serie de cuestiones como: ¿Qué objetivos tenemos? ¿Qué niveles de resolución requerimos? Y también el preguntarse si los recursos a nivel personal, equipamiento y tiempo son los adecuados.

Los marcadores pueden ayudar a solucionar problemas tan importantes como la distinción de cultivares en estadios tempranos no productivos, lo que en algunas especies resulta seriamente difícil y es de gran importancia para la protección de los derechos del obtenedor o del viverista, de cara a posibles problemas de tipo legal que puedan surgir. Es necesario destacar un uso rutinario, pero fundamental, de los marcadores como la comprobación de los genotipos de plantas sometidas a diversos procesos que pueden dar lugar a errores en su denominación posterior, tales como: importación, exportación, multiplicación, conservación etc. (Valadez y Kahl 2005).

2.5.3 ISTRs (Inverse Sequence-Tagged Repeat)

Los ISTRs (Inverse Sequence-Tagged Repeat) Repeticiones de Secuencias Inversas Etiquetadas son marcadores basados en secuencias de retrotransposones y estos son elementos genéticos que se mueven dentro del genoma de un organismo vía ARN. Existe en la mayoría de las plantas y son secuencias que se auto-repican y reinsertan en diferentes partes del genoma (Rohde 1996).

Los ISTRs es una técnica basada en la PCR que permite el análisis del genoma en el reino vegetal y animal.

Esta técnica surge del estudio del ADN geonómico de coco con la enzima EcoRI, el cual mostró unos fragmentos de 1.3-1.4 kb, producto del corte de la enzima. Estos fragmentos mas la región espaciadora fueron secuenciados y revelaron una alta homología con parte del elemento copia BARE-1 de cebada.

Basados en la presencia abundante de los elementos copia en el reino vegetal, se analizaron los ADNs de otras especies de plantas, con el objetivo de demostrar la presencia de estos elementos en otros cultivos además del coco. Para esto se diseñaron cebadores a partir de la secuencia ya conocida de estos elementos copia, que fueran capaces de copiar la región entre ellos (de ahí el término de la secuencia invertida), que es lo que realmente genera polimorfismo.

La detección de polimorfismo asociado a la inserción de retrotransposones en el genoma, crea conexiones nuevas entre el ADN geonómico y las secuencias altamente específicas al final de esos elementos transposables, los cuales para insertarse en el genoma requieren la síntesis de una molécula de ADN de ARN, que sirve de molde (Lightbourn y Villeux, 2003). Los elementos transposables (TEs) fueron descubiertos desde 1950, pero el significado y valor de este descubrimiento como fuente de variación genética en animales y plantas se incubó durante los siguientes 30 años. Los TEs son secuencias de ADN que se mueven y replican dentro de los genomas, por lo

que se les llama también elementos móviles. La mayoría del ADN cromosomal de las plantas es repetitivo y varias clases de elementos móviles forman parte de esas secuencias repetidas (Flavell *et al.*, 1974; Kidwell y Lisch, 1997; Kidwell, 2002).

Diferentes tipos de TEs parecen estar presentes en todas las especies de plantas pero los arreglos genómicos y las alteraciones estructurales y regulatorias de la expresión de genes individuales que ocasionan son muy variables aún en taxa muy relacionados (Bennetzen, 2000).

De acuerdo a los modos diferentes de transposición que manifiestan, los TEs se clasifican en dos clases (Finnegan, 1992): A) Clase I, son elementos transposables que emplean la enzima transcriptasa inversa para su movilidad por medio de un intermediario de RNA. Esta clase incluye retrotransposones de repeticiones terminales largas (LINES) y retrotransposones esparcidos largos y cortos (SINES). Los retrotransposones de repeticiones terminales largas están muy relacionados a los retrovirus (Mallik *et al.*, 2000). Hay dos tipos principales de retrotransposones de repeticiones terminales largas, los Ty1/copia like (Pseudoviridae) y los Ty3/gypsy-like (Metaviridae). B) Clase II, son elementos móviles que se mueven sin intermediarios de una zona del ADN a otra. De acuerdo a Kidwell y Lisch (1997) incluyen transposones como la familia Activator-Dissociation (Ac-Ds) en maíz, el elemento Tam en *Antirrhinum*, el elemento P en *Drosophila* y el elemento Tc1 del gusano *Caenorhabditis elegans*. Una nueva categoría de TEs fue descubierta más tarde cuyo mecanismo de transposición aún no se conoce, son los TEs de repeticiones miniatura invertidas (MITES), estos tienen propiedades tanto de los elementos clase I como de los elementos clase II.

El gran número de loci detectados en un único análisis ISTRs conjuntamente con el alto porcentaje de fragmentos polimórficos, se compara favorablemente con la recientemente desarrollada tecnología de los AFLPs (Amplified Fragments Length Polymorphism)

Las ventajas de los ISTRs sobre los AFLPs son cuatro fundamentalmente: 1) Después del aislamiento del ADN no son necesarias manipulaciones adicionales en el caso del ISTR, 2) La restricción del ADN

geonómico por dos enzimas diferentes, la adición catalizada por la T4 ADN ligasa a los adaptadores y la preamplificación como parte del protocolo de la técnica de los AFLPs, no solo son consumidoras de tiempo si no que además en la reacción de ligación se requiere ADN muy puro, el cual es técnicamente difícil de obtener, 3) La adición de nucleótidos terminales únicos a los adaptadores/cebadores AFLP para una amplificación de la PCR discriminatoria, invoca a un equipo de PCR confiable y altamente exacto, si se desea obtener resultados reproducibles y 4) Los 3 pasos adicionales (restricción, ligazón y preamplificación) encarecen la técnica AFLP respecto al ISTR (Rhode, 1996).

Las aplicaciones prácticas de ISTRs están aparentemente centuplicadas y pueden recorrer (en el campo de las plantas) desde la determinación general de la biodiversidad, la caracterización de especies silvestres, manejo de bancos de genes, estudio sobre la genética de las poblaciones, huellas de variedad para su identificación, siguiendo la introgresión de genes, estudios sistemáticos hasta una posible selección asistida por marcadores en el mejoramiento por la identificación de marcadores co-segregantes con caracteres deseable. Los ISTRs pueden tener un valor potencial para identificar cruces ilegítimos, ya que permiten seguir la introgresión de loci genéticos en un material híbrido (Osorio *et al.*, 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

El material genético que se utilizó en esta investigación consistió de siete líneas de maíz y dos cruza. En el cuadro 1 se mencionan las versiones de los alelos que posee cada una, es decir, la variante del factor gametofítico que se quiere identificar.

Cuadro 1. Relación de las líneas e híbridos de maíz estudiados

Línea/híbrido	No. de identificación de material	Alelos
W22	597	<i>gal (control)</i>
NC 354	181	<i>Gal-S</i>
NC 354 X W22 P 4830	194	<i>Gal-S</i>
W22 P 4830	593	<i>Gal-S</i>
LUG-03	183	<i>Gal-m</i>
LUG-03 X W22	196	<i>Gal-m, Tcb1-S</i>
W22 TIC ver. 1.7	587	<i>Gal-m, Tcb1-S</i>
W22 TIC ver. 1.1	18	<i>Gal-m, Tcb1-S</i>
W22 TIC ver. 1.5	19	<i>Gal-m, Tcb1-S</i>

W22 = University of Wisconsin

NC = North Carolina State University

LUG = Línea Universidad de Guadalajara

Estos materiales fueron proporcionados por el Dr. J.J. Sánchez González (IMAREFI), el tejido se colectó en el campo experimental del CUCBA, obteniendo muestras de hojas frescas de cada uno de ellos, las cuales se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su procesamiento.

3.2 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico, se realizó de acuerdo al método reportado por Saghai-Maroo (1984), utilizando muestras de hojas jóvenes obtenidas del campo experimental y de invernadero del IMAREFI en el CUCBA.

Una vez obtenido el ADN de cada uno de los materiales, se determinó la calidad y concentración del mismo, utilizando espectrofotómetro (JENWAY mod. 6305) y por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

3.3 Amplificación

Para la amplificación por PCR se utilizó el protocolo reportado por (Osorio *et al.*, 2006) en donde la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl, utilizando 50 ng de ADN, 0.3 µM de cada uno de los iniciadores, Buffer PCR 1X, 3 mM de MgCl₂, 0.025 U Taq polimerasa y 0.025 mM dNTPS. Se emplearon dos combinaciones de primers F9/B6 y F1/B6 donde F indica el iniciador Forward (Hacia adelante) y B el Reverse (Hacia atrás) (Cuadro 2).

Posteriormente se separaron los fragmentos amplificados en un gel de poliacrilamida al 6% en cámara de electroforesis vertical a 200 volts durante 5 horas y para su visualización fueron teñidos con sales de plata de acuerdo al protocolo de (Sanguinetti *et al.*, 1994).

Cuadro 2: Descripción de los iniciadores utilizados en la investigación

Primer	Secuencia 5' - 3'
F9	TTA CCT CCT CCA TCT CGT AG
B6	GGT TCC ACT TGG TCC TTA G
F1	GCA CTC CAC CAA GAA TAC C

3.4 Análisis Estadístico

Se identificó el número de bandas polimórficas en el gel teñido, con las cuales se obtuvo la matriz de presencia/ausencia para cada combinación de

cebadores. Para calcular la similitud entre los materiales utilizados, se usó el coeficiente de Jaccard, estimado como $S_j = V_{ij} / (v_{ij} + w_{ij} + x_{ij})$ donde v_{ij} se refiere las bandas en común entre dos unidades taxonómicas operacionales i y j ; w_{ij} es el número de bandas presentes en i y ausentes en j ; y x_{ij} es el número de bandas presentes en j y ausentes en i . , cabe mencionar que este coeficiente mide la proporción de bandas entre dos unidades taxonómicas, excluyendo aquellas ausentes en ambas unidades (Reif *et al.*, 2004) y se realizó el análisis de agrupamiento por el método UPGMA (Unweighted Paired Group Method Using Arithmetic Averages) (Reif *et al.*, 2004) contenido en el programa NTSYS 2.11 reportando los resultados de manera gráfica en un dendrograma.

IV. RESULTADOS

Los supuestos en los que se basa el análisis con el marcador ISTR, han sido elaborados tomando en cuenta los sitios que reconoce el marcador, es decir las secuencias en donde se encuentran los retrotransposones dentro del genoma de la planta. Estos son: que el marcador es dominante, que amplifica loci específicos y que el polimorfismo encontrado se debe a diferencias de posición de los retrotransposones a lo largo de la cadena de ADN genómico.

Se estandarizó el método reportado por Rhode (1986) para las condiciones del laboratorio de Marcadores Moleculares del IMAREFI. Esto es, se ajustaron las diluciones del ADN objetivo a 50 ng/ μ l y se aplicaron las concentraciones que se marcan en el anexo para la reacción PCR en un volumen final de 20 μ l.

Las bandas obtenidas fueron consistentes en los geles de poliacrilamida al 6% con los que se separaron los fragmentos amplificados. Así mismo, se estandarizaron los pasos marcados para la tinción de los geles, con los que se obtuvo una nitidez apropiada para la observación de las bandas y para la elaboración de la matriz de presencia/ausencia.

Como resultado de las condiciones de PCR mencionadas, se observaron fragmentos amplificados en el gel de poliacrilamida con las dos combinaciones de cebadores (Figura 2). Se obtuvieron algunas bandas polimórficas algunas de las cuales se marcan en la figura con flechas. Por lo anterior, puede decirse que este marcador, genera un patrón de amplificación específico para esta especie y que permite diferenciar entre materiales, ya que se obtienen bandas polimórficas.

Por otra parte, se encontraron bandas monomórficas en los materiales con ambas combinaciones, lo cual es consistente con la especificidad de los *primers*, ya que se utilizó la misma secuencia que actúa en dirección 5' a 3' reverse (B6).

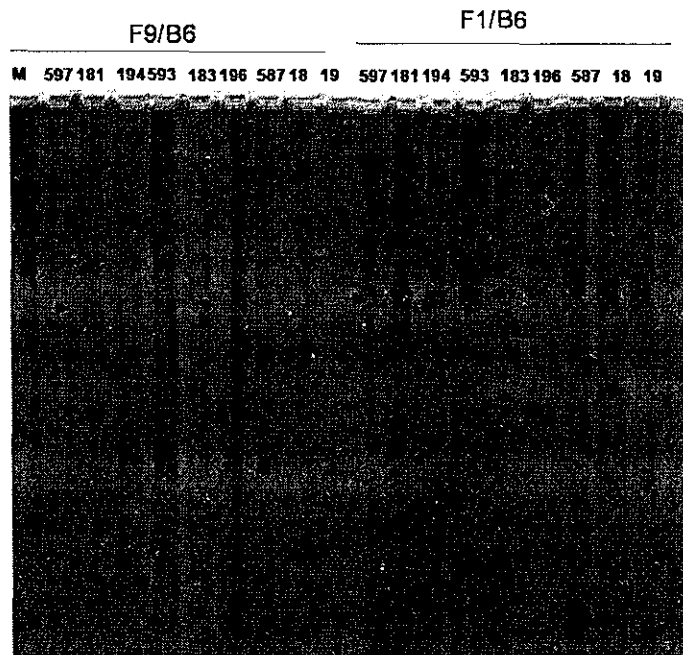


Figura 2. Patrones de amplificación con dos combinaciones de cebadores para ISTR en muestras de *Zea mays*.

Los dendrogramas obtenidos con el análisis de similaridad y de agrupamiento, muestran la relación que detectó el marcador molecular en los materiales estudiados.

Como se indicó en el cuadro de materiales usados en el presente trabajo, los materiales marcados con el número 597, 183 y 196 corresponden a las líneas W22 (*ga1* control), LUG03 (*Ga1-m*) y la cruce LUG03 (*Ga1-m*) X W22 (TIC 1.7) respectivamente, estos materiales fueron agrupados de manera individual en el dendrograma de la Figura 2, lo que puede deberse a que el marcador identificó el genoma común que poseen los tres materiales, con respecto a las líneas de origen W22 y LUG03.

Por otra parte, en el mismo dendrograma se formó un grupo más, con los materiales 181, 593, 18, 587 y 19. En este grupo destaca la similaridad que marca el valor 0.78 del coeficiente de Jaccard entre los materiales 587 y 19 que tiene en común la línea W22 y el TIC, versiones 1.7 y 1.5 respectivamente. En el mismo grupo, se incluyeron los materiales 593 y 18 que tiene la línea W22 y

se marcan con una similaridad de 0.75, que contienen *Ga1-S* y TIC 1.1. En este grupo se incluyó la línea 181 (NC 354) conteniendo el alelo *Ga1-S*.

Fuera de los grupos, con un coeficiente de similaridad de 0.49 se encuentra la cruce entre las líneas NC354 X W22.

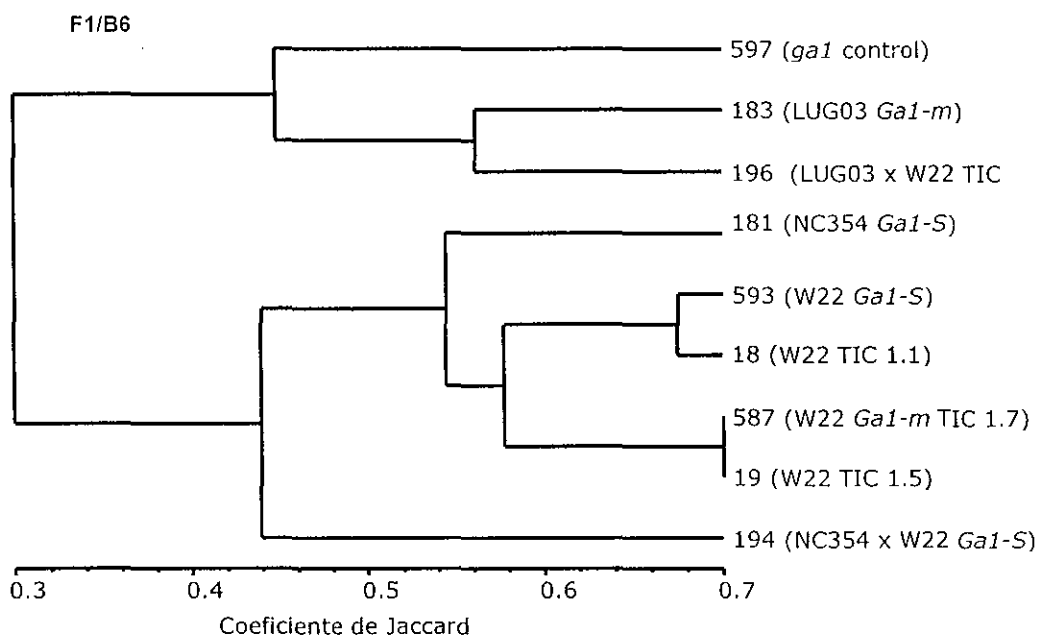


Figura 2. Dendrograma generado con la matriz desarrollada con la combinación F1/B6 de iniciadores de ISTR para 7 líneas de maíz y dos cruces.

Cabe mencionar que según lo detectado por el marcador, los materiales que contienen el complejo de incompatibilidad del teocintle TIC se ubicaron dentro del mismo grupo, lo que podría suponer que se está detectando la presencia del alelo *tcb -1* o el modificador que forma parte del complejo.

La similaridad que se detectó con la combinación F9/B6 de iniciadores, se presenta en la Figura 3, que muestra una agrupación diferente a la detectada con la combinación anterior.

En este caso, se presentan fuera del grupo formado, las líneas 597 (W22 control) y la 181 (NC354), agrupándose los materiales 194 y 593 que son la cruce NC354 X W22 y la línea W22 que tienen en común el alelo *Ga1-S*. Así mismo se encontró una similaridad de 0.64 entre las líneas 587, 18 y 19 cuyo origen común es la línea W22 con el complejo de incompatibilidad del teocintle

TIC, destacándose mayor similitud entre las líneas 18 y 19 (0.77). Finalmente, la línea 183 (LUG 03) y 196 (LUG 03 X W22) sólo están asociadas a nivel 0.40 según el coeficiente de Jaccard.

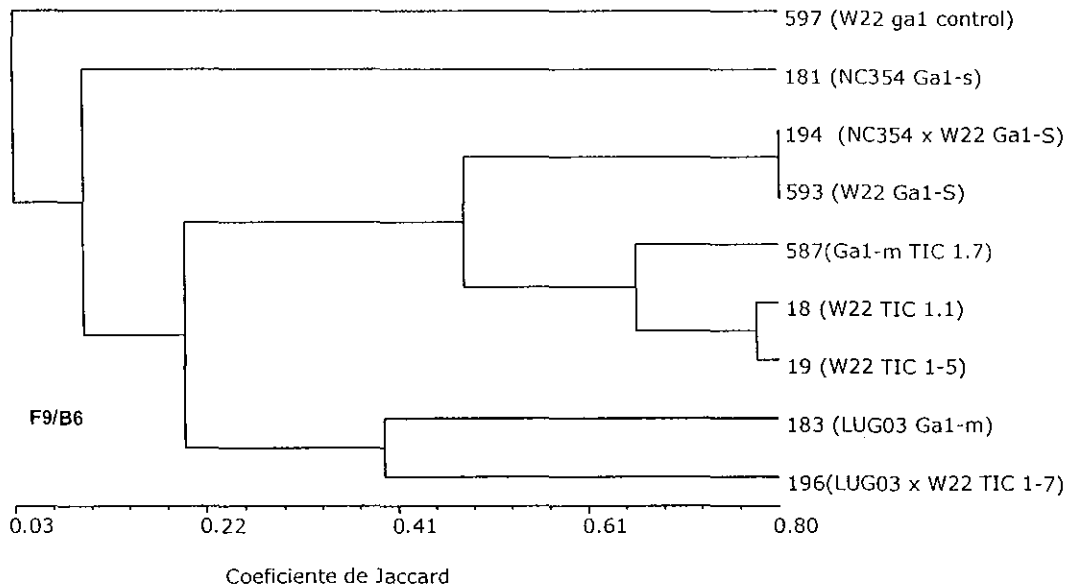


Figura 3. Dendrograma generado con la matriz desarrollada con la combinación F9/B6 de iniciadores de ISTR para 7 líneas de maíz y dos cruas.

Los resultados obtenidos muestran que las combinaciones de ISTR utilizadas, detectan similitudes entre los materiales dependiendo de la parte del genoma en el que se ubican los retrotransposones a los que se refiere su secuencia, esto permite diferenciar desde diferentes puntos los cambios que éstos provocan en las secuencias originales del ADN en estudio.

En el caso de la combinación de iniciadores F1/B6 aparentemente se relacionaron los híbridos con las líneas que le dieron origen, y en el caso de algunos materiales, con el factor gametofítico que contienen.

Por otra parte, en lo que se refiere a la combinación de primers F9/B6, las similitudes marcadas están más relacionadas con dichos factores, ya que agrupó los materiales que contienen el complejo de incompatibilidad del teocintle (TIC).

Es necesario realizar mayor número de pruebas con diferentes materiales y combinaciones de iniciadores, para ubicar con mayor precisión si el agrupamiento que se detecta es debido a estos factores de incompatibilidad o simplemente a secuencias conservadas dentro del genoma de los materiales.

V. CONCLUSIONES

- El marcador molecular ISTR reconoce sitios específicos dentro del genoma de maíz, que corresponden a las posiciones de retrotransposones.
- Es posible aplicar el protocolo para ISTRs en muestras de líneas e híbridos de maíz para detectar características genéticas específicas.
- Es posible detectar con este marcador ISTR, asociaciones entre los híbridos y las líneas de las que proceden.
- Se requiere mayor número de pruebas para detectar asociación clara entre la presencia de factores gametofíticos de incompatibilidad y patrones de amplificación.
- Probablemente la combinación F9/B6 detecta algunas de las secuencias que componen el complejo TIC

VI. LITERATURA CITADA

- Bennetzen, J. L. 2000. Transposable element contribution to plant gene and genome evolution. *Plant Molecular Biology* 42: 251-269.
- Casas Salas, J.F., J.J. Sánchez G., J.L. Ramírez D., J. Ron Parra y S. Montes H. 2001. Rendimiento y sus componentes en retrocruzas Maíz-Teocintle. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 24(1): 17-26.
- De la Cruz L., L. 2006. Apuntes de la clase Genotecnia Vegetal CUCBA, Universidad de Guadalajara.
- De la Cruz L., L. 2007, Sistema de incompatibilidad Genética en Maíz y Teocintle (*Zea spp.*) en México. Tesis de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Forestales CUCBA- Universidad de Guadalajara.
- Doebley, J. 1990. Molecular evidence and the evolution of maize. *Econ. Bot.* 44: 6-27.
- Doebley, 2004, The genetics of maize evolution. *Annual Review of Genetics* 38: 37-59.
- Finnegan, D.J. 1992. Transposable elements. *Current Opinión in Genetics and Development* 2: 861-867.
- Flavell, R. B., M. D. Bennett, J. B. D. B. Smith. 1974. Genome size and proportion of repeated nucleotide-sequence DNA in plants. *Biochemical Genetics* 12: 257-269.
- García, G.M., H.T. Stalker, and G. Kochert. 1995. Intogression analysis of an interespecific hybrid population in peanuts (*Arachis hypogaea L.*) using RFLP and RPD markes. *Genome* 38: 166-176.
- Goodman, M.M. 1985. Exotic maize germplasm: Status, prospect, and remedies. *Iowa St. J. Res.* 59: 497-527.
- INFROAGRO. 2006. <http://www.infoAgro.com/herbaceos/cereales/maíz.htm>.
- Kermicle, J. L y J. O. Allen. 1990. Cross-incompatibility between maize and teosinte. *Maydica* 35: 399-408.
- Kermicle, J.L., S. Taba y M.M.S. Evans 2001. The Gametophyte-1 locus and reproductive insolation among *Zea mays* subspecies. *Maydica* 51: 219-226.

- Kermicle, J.L., 1991. Compatibilidad de cruzamiento dentro del género *Zea*,
En: J.A. Serratos, M.C. Willcox y F. Castillo (eds.). Flujo Genético
entre Maíz criollo, Maíz Mejorado y Teocintle: Implicaciones para el
Maíz Transgénico, México, D.F. CIMMYT. pp: 43-47.
- Kidwell, M. G., D. Lisch. 1997. Transposable elements as source of
variation in animals and plants. *Proceedings of the National Academy
of Science USA* 94: 7704-7711.
- Kidwell, M. G. 2002. Transposable elements and the evolution of genome
size in eukaryotes. *Genetica* 115: 49-63.
- Lightbourn, G., R. Veilleux. 2003. Retrotransposon based markers to
caracteriza somatic hybrids and assess variation induced by
protoplast fusion of monoploid potato. *Acta Horticulturae ISHS* 619.
- Márquez, F. 1988. *Genotecnia Vegetal*. AGT Editor, S.A. pp 17-23.
- Morán M., M.C y López U., A. 2006 *Manual del Curso Teórico Practico de
Genética Molecular*. División de Medicina Molecular. CIBO I.M.S.S.
- Nelson, O.E. 1993. The gametophyte factors of maize. En: M. Freeling and
V. Walbot, (eds.) *The maize Handbook*. Springer-Verlag.
- Mallik, H.S., S. Henifoff, T.H. Eickbush. 2000. Poised for contagion:
evolutionary origins of the infectious abilities of invertebrate
retroviruses. *Genome Research* 10: 1037-1318.
- Matsuoka Y., Y. Vigouroux, M.M Goodman, J. Sanchez G., E. Buckler, J.
Doebley, 2002 A single domestication for maize shown by multilocus
microsatellite genotyping. *Proc. Natl Acad. Sci.* 99: 6080-6084
- Murphy, J.P., C.A. Griffey, P.L. Finney, and S. Leath. 1997. Agronomic and
grain quality of *Triticum aestivum* x *Aegilops tauschii* backcross
population. *Crop Sci.* 37: 1960-1965.
- Mutschel, M. and B.E. Liedl. 1994. Interspecific crossing barriers in
Lycopersicon and their relationship to self incompatibility and
reproductive control in flowering plants. Klower Press. Pp. 164-188.
- Osorio Z., M.A., D. Infante y S. Molina M. 2006. Estudio de la variabilidad
genética asexual en *Agave cocui* Trelease mediante el uso de
marcadores moleculares. *Bol. Nakari* 17 (1): 1-7.

- Reif, J.C., A.E. Melchinger y M. Frisch. 2004. Genetical and Mathematical Properties of Similarity and Dissimilarity Coefficients Applied in Plant Breeding and Seed Bank Management. *Crop Science* 45:1-7.
- Rhode, W. 1996. Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR based technique for genome analysis in plant and animal kingdom. *Journal of botany* 89:312-326.
- Rodríguez F., J.G. 2006. Biología del polen y estigmas en especies del Genero *Zea* en México. Tesis de Posgrado de Ciencias Agrícolas y Forestales. CUCBA- Universidad de Guadalajara.
- Ruiz L., C. 2002. Desarrollo de Marcadores Moleculares de aplicación en Genómica y programa de mejora de Cítricos. Tesis de Posgrado Departamento de Genética, Universidad de Valencia, España.
- Saghai-Marouf, M A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen y R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian Inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA*. Vol 81, pp 8014-8018.
- Sambrook J. Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press Laboratory Press. New York, EUA.
- Sánchez G., J.J y J. A. Ruiz C. 1996. Distribución del teocintle en México. In: J.A. Serratos, M.C. Willcox y F. Castillo (eds.). *Flujo Genético entre Maíz criollo, Maíz Mejorado y Teocintle: Implicaciones para el Maíz Transgénico*, México, D.F. CIMMYT. pp: 20-38.
- Sanchez G., J.J, 2003. Apuntes de la clase conservación de Recursos Fitogenéticos. CUCBA-Universidad de Guadalajara.
- Sanguinetti CJ, Días Neto E, Simpsom AJ. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*; 17 (5). 914-21.
- SEP- 2001. *Manual para educación agropecuaria, Maíz*. Ed. Trillas.
- Tanksley, S.D., S Grandillo, T.M Fulton, D. Zamir, Y. Eshed, V. Petiard, J. López, and T. Beck-Bunn. 1996 Advanced Backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theor. Appl. Genet* 92: 213-224.

Valadez, M., E. y Kahl, G. 2005. Huellas de AND en genoma de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Universidad Autónoma de Chapingo.

GLOSARIO

Ácidos Nucleicos	Son macromoléculas, polímeros formados por la repetición de monómeros llamados nucleótidos, unidos mediante enlaces fosfodiéster.
ADN	Es la abreviatura del ácido desoxirribonucleico.
AFLP	Combinación de los métodos de PCR y análisis de fragmentos de restricción, con el fin de detectar polimorfismos debidos a modificaciones en la secuencia de ADN.
ARN	Ácido ribonucleico (ARN o RNA) es un ácido nucleico, polímero lineal de nucleótidos formando una larga cadena.
Bases nitrogenadas	Son compuestos orgánicos cíclicos, que incluyen dos o más átomos de nitrógeno. Son parte fundamental de nucleótidos y ácidos nucleicos.
Caracterización	Es la toma de datos que consiste en registrar aquellas características ya sean cualitativas o cuantitativas.
dH₂O	Agua destilada.
ddH₂O	Agua destilada y desionizada.
Electroforesis	Técnica para la separación de moléculas (proteínas o ácidos nucleicos) sobre la base de su tamaño molecular y carga eléctrica.
Espectrofotómetro	Instrumento usado en la física óptica que sirve para medir, en función de la longitud de onda, la relación entre valores de una misma magnitud fotométrica relativos a dos haces de radiaciones.
Fenético	Sistema de clasificación de los organismos que intenta demostrar su similitud. Los organismos se agrupan por sus características

	físicas medibles. Se usan caracteres morfológicos (a ser posible el mayor número).
Filogenético	Descubrir que árbol describe la evolución de los caracteres del grupo con el número más pequeño de cambios (árbol más <i>parsimonioso</i>).
Gen	Punto de vista Genético: Es la unidad básica de herencia de los seres vivos// Punto de vista molecular: Fragmento de ADN.
Grupo fosfato	Los grupos fosfato se encuentran en el ADN y ARN, y en ciertos lípidos. Están involucrados en el almacenamiento biológico y liberación de energía.
IMAREFI	Instituto de Mejoramiento y Aprovechamiento de Recursos Fitogenéticos.
ISTR	Repeticiones de Secuencias Inversas Etiquetadas.
Locus	Es el lugar donde está un gen en un cromosoma. Todos los alelos de un gen pueden estar en el mismo locus.
Marcador	Son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético.
Microlitro (μl)	Unidad de medición de pequeños volúmenes.
Molécula	Es una partícula formada por un conjunto de átomos ligados por enlaces covalentes, metálicos, o iónicos de forma que permanecen unidos el tiempo suficiente como para completar un número considerable de vibraciones moleculares.
Nitrógeno Líquido	El nitrógeno líquido tiene una aplicación muy extendida en el campo de la criogenia como agente enfriante. Su uso se ha visto incrementado con la llegada de los materiales cerámicos que se

	vuelven superconductores en el punto de ebullición del nitrógeno.
Nucleótido	Es un compuesto monomérico formado por una base nitrogenada, un azúcar de cinco átomos de carbono (pentosa) y ácido fosfórico.
PCR	Polymerase Chain Reaction (por sus siglas en inglés) Reacción en Cadena de la Polimerasa.
Polimorfismo	Diferencia entre individuos, detectable en un marcador particular.
Primer	Sirve de punto de anclaje para la DNA polimerasa y como promotor del inicio de la reacción de replicación del DNA.
Retrotransposon	Elementos genéticos móviles vía ARN.
TIC	Complejo de Incompatibilidad del Teocintle.
Teocintle	Gramínea silvestre, reconocida como el ancestro del maíz.

ANEXOS

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Saghai-Marooof *et al.*, (1984)

1. Programar Baño María a 60° C.
2. Triturar 300 mg de tejido con nitrógeno líquido en mortero con pistilo.
3. Agregar 0.5 ml de 2X CTAB buffer y moler nuevamente hasta que la mezcla quede homogénea.
4. Transferir la mezcla a tubos eppendorff de 2 ml e incube 30 minutos a 60° C en baño María
5. Deje enfriar por 10 minutos para que la mezcla regrese a temperatura ambiente.
6. Agregue un volumen igual de cloroformo-octanol (24:1) e invierta los tubos continuamente por 5 minutos.
7. Centrifugue a 12000 rpm por 10 minutos.
8. Recupere el sobrenadante y páselo a un tubo limpio. (utilice tubo de 2 ml la primera vez y tubos de 1.5 la segunda vez)
9. Repetir pasos 6, 7 y 8.
10. Agregue un volumen igual de alcohol isopropílico frío (-20° C) y mezcle por inversión hasta que el ADN precipite.
11. Centrifugue a 5000 rpm durante 5 minutos. Decante el isopropanol y agregue 1.0 ml de 76% EtOH/0.2M Na-acetato. Deje el ADN en esta mezcla por 20 minutos. (se puede parar en este punto si es necesario y continuar más tarde en el día). Agite por 5 minutos antes de continuar al paso 12. Centrifugar 5000 rpm por 5 minutos.
12. Decante el 76% EtOH/0.2 Na-acetato y agregue 0.5 ml de 76% EtOH/10mM NH₄-acetato. Deje el ADN en esta mezcla por 1 o 2 minutos, centrifugue de nuevo y luego decante el 76% EtOH/10mM NH₄-acetato.
13. Agregue 50 a 100 µl de T.E. La cantidad depende de que tan buena fue su obtención. Coloque a 4° C durante la noche para que el ADN se resuspenda en la solución.
14. Día siguiente centrifugue por 10 minutos para las partículas no disueltas y transfiera el sobrenadante a un tubo limpio.

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

Dilución de las muestras para la lectura en espectrofotómetro

Agregar 10 µl de muestra de ADN a un tubo que contenga 990 µl de agua ultrapura. Mezclar y leer la absorbancia en el espectrofotómetro a 260 y 280 nm.

Preparación del gel de agarosa

1. Agregar la base (portageles) de la cámara donde se prepara el gel.
2. Para preparar un gel de agarosa 0.1%, agregar 1 g de agarosa a 60 ml de amortiguador TBE 1X.
3. Hervir hasta que la agarosa se disuelva y enfriar la dilución a 60° C.
4. Vaciar con cuidado la agarosa disuelta en el portageles y remover las burbujas usando una pipeta Pasteur.
5. Después de que el gel se haya solidificado, remover los extremos del portageles y colocarlo dentro de la cámara de electroforesis.
6. Remover el peine cuidadosamente evitando que se rompa el gel.
7. Cubrir con el con amortiguador TBE 1X hasta que quede sumergido a 4 mm de profundidad respecto a la superficie del TBE 1X.

Preparación de las muestras de ADN para la electroforesis en el gel de agarosa

1. El amortiguador de carga (Jugo Azul) se compone de Xylen Cyanol, Azul de Bromofenol y Glicerol: el glicerol hace a la muestra más densa que el amortiguador de corrida (TBE 1X), permitiendo que el ADN se mantenga dentro del pozo del gel y la adición de los 2

colorantes hace posible seguir el movimiento de las muestras durante la electroforesis.

2. Colocar cuidadosamente las muestras de ADN en cada uno de los pozos del gel, sin derramarla en los pozos adyacentes. Asegurarse de incluir una línea con el marcador de peso molecular del ADN (por ejemplo, usar 250 ng de ADN de lambda cortando con Hind III).
3. Tapar la cámara de electroforesis y colocar los electrodos, asegurarse de que la Terminal negativa (negra) está en el mismo extremo del aparato. Escender la fuente de poder a 80 volts.
4. Apagar la fuente de poder cuando el frente del color esté a 2 cm del extremo positivo.

Nota: La cantidad de la muestra que debe ser colocada en los pozos depende del grosor del análisis así como de las dimensiones del peine que se utilice.

La documentación del gel se puede llevar a cabo de dos maneras; la primera es utilizando un sistema analizador de geles, que consta de un scanner o cámara fotografía y un programa de computadora apropiado para este tipo de análisis. La segunda forma, es a través de una cámara fotográfica normal que tenga un filtro color naranja con rollo de alta sensibilidad para fotografías blanco y negro.

Tinción y Observación

1. Remover el gel del aparato de electroforesis y sumergirlo en una solución de bromuro de etidio (0.5 mg/L en 500 ml de agua) por 30 minutos.
2. Observar el gel sobre un transiluminador de luz UV y documentarlos.

Precaución: El bromuro de etidio es un potente agente mutagénico y cancerígeno por lo que nunca debe manipularse sin guantes. Varios protocolos describen como inactivar esta sustancia (ver Sambrook *et al.*, 2001). La solución una vez preparada, puede utilizarse varias veces siempre y cuando se

mantenga en la oscuridad y debe colocarse separadamente de otros desechos de laboratorio en recipiente apropiados cuando sea eliminada.

La luz UV es dañina al exponer los ojos y la piel. Al irradiar el gel, deben usarse anteojos especiales o caretas de protección y bata de laboratorio. También este tipo de luz daña al ADN por lo que no debe ser expuesto por largos períodos de tiempo, sino solamente lo necesario (no más de 30 seg. cada vez).

Preparación de soluciones stock

Tris 1 M pH 7.5, 8.0 o 9.5 (P.M. 121.14)

1. Disolver 121 g TRIS-Base en aprox. 750 ml dH₂O.
2. Añadir HCl hasta alcanzar el pH deseado (75 ml HCl = pH 7.5; 49 ml HCl = 8.0).
3. Aforar a 1000 ml con dH₂O.

Cloruro de sodio (NaCl) 5 M (PM= 58.44). Este producto puede encontrarse ya preparado como reactivo especial para biología molecular.

EDTA 0.5 M pH 8.0 (PM= 372.24)

1. Disolver 186.12g de Na₂EDTA-2H₂O en aproximadamente 750 ml de dH₂O.
2. Añadir pellets de NaOH hasta alcanzar un pH de 8.0.
3. Cuando el EDTA esté disuelto, aforar a 1000 ml con dH₂O.

Una vez preparada las soluciones stock de TRIS y EDTA se almacenan en refrigeración y a partir de ellas se produce a preparar el buffer de extracción haciendo cálculos basándose en el número de muestras a extraer.

BUFFER TE:

10 Mm Tris

1mM EDTA (pH 8.0)
 20% sodium dodecyl sulphate (SDS) (w/v) –no refrigerado-
 5 M acetato de potasio –20°C Buffer lisis (60mL acetato de potasio 5M,
 11.5 mL de ácido acético glacial y 28.5mL agua (Sambrook *et al.*, 2001).
 Acetato de sodio 3 M –20°C
 Etanol al 70% -20°C
 Isopropanol absoluto –20°C.

TBE 5X:

54 g de trizma base
 27.5 g de ácido bórico
 20 ml de EDTA 0.5M pH 8.0

2X cTAB + Bisulfito

Compuesto	Cantidad	Concentración final
Tris-HCl 1M pH 7.5 u 8	10 ml	100 mM
cTAB	2 g	2 %
NaCl 5 M	28 ml	700 mM
EDTA 0.5 M pH 7.5 u 8	4 ml	20 mM
β-mercaptoetanol*	1 ml	1 %
Bisulfito de sodio	1 g	1 %

*Añadir en el momento usarlo
 Aforar con agua destilada a 100 ml

76% ETOH/0.2M Na-acetate

Compuesto	Cantidad
Acetato de sodio	2.72 g
Etanol (ETOH) 95%	80 ml
dH ₂ O	Aforar a 100 ml

76% ETOH/10mM NH₄-acetate

Compuesto	Cantidad
Acetato de amonio	0.077 g
Etanol (ETOH) 95%	80 ml
dH ₂ O	Aforar a 100 ml

*Reacción típica de PCR para ISTR (Rhode1996, Osorio *et al.*, 2006)*

Reactivo	Concentración Final
H ₂ O	
Buffer PCR 10X	1 X

MgCl ₂ 25 mM	3 mM
F (Forward) 10mM	0.3 uM
B (Reverse) 10mM	0.3 uM
dNTPs 10 mM	0.25 mM
Taq. Polim.5 U	0.25 mM
ADN 50 ng	

Programa termociclador

95° 3 min	} 40 ciclos
95° 30 seg	
45° 1 min	
72° 2 min	
72° 2 min	
4° ∞	

Preparación del gel de Acrilamida

Los vidrios de la cámara de electroforesis deben estar muy limpios y ser cuidadosamente tratados, el más pequeño será tratado con una solución de Bind Silane para fijar el gel a dicho vidrio y el más grande con una solución Repel de manera que se fácilmente separado del gel. Una vez tratados los vidrios se arma el molde utilizando los separadores adecuados.

Bind Silane: Se distribuye homogéneamente (1ml) sobre la superficie del vidrio que quedará en contacto con el gel, se deja secar 5 min y luego se retira el exceso con etanol (3 veces).

Repel: Se distribuye homogéneamente (1ml) sobre la superficie del vidrio que quedará en contacto con el gel, se deja secar 5 min y luego se retira el exceso con agua destilada (una vez).

Componentes del gel de Poliacrilamida

MEZCLA	CANTIDAD
Archilamida 40%	10.5 ml
T.B.E 10X	7.0 ml
Urea	32.2 g
APS	240 μ l
Temed	32 μ l

Preparada esta mezcla debe verterla rápidamente en el molde, colocar los peines y dejar polimerizar por lo menos 30 minutos.

Condiciones de corrida para la electroforesis:

- Se utilizará como buffer de corrida TBE 1X
- Se precalienta el gel a 75 W hasta alcanzar una temperatura de 48-50 °C
- Se cargan 8 μ L de muestra
- La corrida se realizará a 65 W.

Tinción con Sales de Plata

A) Solución Reveladora

COMPONENTES	CANTIDAD
Hidróxido de Sodio	30 g
Formaldehído 37%	15 ml
H ₂ O dd	1 L

B) Solución fijadora

COMPONENTES	CANTIDAD
Acido Acético Glacial	5 ml
Alcohol Etanol	100 ml
H ₂ O dd	1 L

C) Solución de Nitrato de Plata

COMPONENTES	CANTIDAD
Nitrato de Plata (AgNO_3)	2 g
Solución Fijadora	1 L

Pasos

SOLUCIÓN	TIEMPO
1.- Solución Fijadora	5 min
2.- Decantar la solución fijadora	
3.- Sol. Nitrato de Plata	5 min
4.- Decantar	
5.- Lavar con H_2O dd	
6.- Solución Reveladora	Hasta aparición de bandas
7.- Enjuagar con H_2O	

Preparación de la Poliacrilamida 40% (1 L)

Acrilamida	380 g
N, N Methilenbisacrilamida	20 g
H_2O dd	600 ml

Preparación de la Poliacrilamida 6%

Acrilamida 40%	30 ml
Urea	92 g
T.B.E. 5 X	40 ml
H_2O dd	Aforar a 200 ml