

Identificación y seguimiento de la variabilidad genética en líneas endogámicas de maíz con progenitores criollos mediante marcadores moleculares

Alberto Gutiérrez, César Aguirre, Juan Ramírez y Juan Raya

A. Gutiérrez, C. Aguirre, J. Ramírez y J. Raya
Instituto Tecnológico de Roque, División de Estudios de Posgrado e Investigación, km 8 Carretera Celaya-J. Rosas,
C.P. 38110.
ceaguirre@itroque.edu.mx

M. Ramos., V. Aguilera., (eds.) Ciencias Agropecuarias, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, 2013.

Abstract

Knowledge of genetic diversity and the relationship between maize (*Zea mays* L.) inbred lines is indispensable in a breeding program. Maize is a staple crop and the most important food in the Mexican diet however there is now a production deficit. The objective of this work is to select a collection of type SSRs markers related to desirable characteristics of inbred lines and analyze using SSR the genetic diversity of the original population and inbred lines. The collection of the initial population was 600 genetic materials selected for their outstanding agronomic characteristics; by the 2010 cycle were selected only 80 lines S1, which were evaluated to select genotypes that surpassed in performance landraces.

From this assessment, seven lines were derived S2, which were evaluated in this work, to continue the process of formation of inbred lines. Genetic variation shows a high polymorphism and a population distribution with low desirable characteristics traits establishment.

8 Introducción

La generalización de las técnicas de Biología Molecular ha tenido, entre otras, dos consecuencias trascendentales. Por una parte nos han dotado de una poderosa herramienta de uso general para el análisis genético tanto en estudios básicos como aplicados, los marcadores moleculares. Por otra nos han dado una visión mucho más completa de la variabilidad genética y su distribución a distintos niveles: individual, población, especie.

El uso de tales herramientas y los nuevos datos adquiridos con ellas están teniendo profundas repercusiones teóricas y prácticas.

El mejoramiento de poblaciones de maíz por métodos convencionales se caracteriza por ser un proceso lento y sin información detallada acerca de la evolución de los caracteres seleccionados; por ello, los materiales liberados en ocasiones quedan desfasados en relación a las condiciones del campo; además, existen dificultades en la caracterización y protección intelectual de las variedades generadas.

Se genera un desconocimiento de los caracteres secundarios que cosegregan en las selecciones y los programas nacionales resultan con baja competitividad frente a las empresas transnacionales de producción de semilla.

Cada vez es más apremiante la necesidad de obtener variedades a corto plazo, más adaptadas a las condiciones ambientales del sistema de temporal regular a bueno con una entrada mínima de insumos e incrementar el potencial productivo de los agro-ecosistemas.

Actualmente el proceso de liberación de variedades mejoradas para condiciones de temporal es muy lento debido a la poca eficiencia de la selección por efecto del medio ambiente; la aplicación de estas tecnologías permitirá acelerar el proceso de liberación de materiales. Cabe señalar que a la fecha es poca la interacción que existe entre los fitomejoradores tradicionales y biotecnólogos.

Esta interacción es necesaria pues resulta urgente alimentar a la población en constante crecimiento y adaptar las prácticas agrícolas de cara al cambio climático.

Al acortar los plazos de selección y liberación de variedades se logrará un ahorro sustancial de recursos económicos, humanos y ambientales.

Las empresas trasnacionales no se ocupan de la mejora de plantas para la agricultura de temporal y las instituciones nacionales que lo hacen están limitadas por la disponibilidad de recursos y de personal.

Como se ha señalado parece haber falta de conexión entre los laboratorios que hacen biología molecular, proteómica, metabolómica y secuenciación de genomas y los fitomejoradores tradicionales.

Es necesaria pues establecer el nexo y la colaboración para que los resultados obtenidos en los laboratorios que usan tecnologías de punta puedan ser aprovechados en desarrollo efectivo del campo mexicano.

Con este proyecto se pretende avanzar conjuntamente en la selección de líneas mediante criterios fenotípicos, pero también incluyendo una caracterización a nivel molecular y bioquímico.

Entre los cereales más importantes, se encuentra el maíz, que es el cultivo más importante en México, desde el punto de vista alimentario, industrial, político y social; su importancia radica en la amplia utilización para la alimentación humana y animal.

Este cultivo se utiliza como grano en la alimentación humana, como materia prima en la industria y la planta puede emplearse como forraje verde, ensilado, rastrojo, forraje fresco y materia orgánica al suelo; finalmente como mazorca tierna (elote) se consume como alimento fresco; actualmente, uno de los usos más sobresalientes es que el grano se está empleando para obtener biocombustibles (Reyes, 1990), práctica la cual ha sido prohibida en México por representar una amenaza a la soberanía alimentaria del país, en varios países se sigue usando maíz como materia prima para producir etanol, lo que supone algunos inconvenientes.

El principal, el más criticable desde el punto de vista moral, que produce un aumento en el precio de los alimentos, ya que hay una menor disponibilidad de una materia esencial, como es el maíz. Sobre todo, en un país como México.

En el Estado de Guanajuato se siembra en promedio 375,000 hectáreas con maíz bajo condiciones de temporal (50 mil en riego punteado y 325 mil en temporal), de las cuales, el 12% se pierde totalmente por efectos de sequía y la superficie restante presenta pérdidas parciales en el rendimiento (SIAP, 2009).

El maíz mexicano padece las consecuencias de una baja productividad, escenario que ha permitido un aumento sostenido en las importaciones del grano, que alcanzaron en el 2011 un monto superior a 10 millones de toneladas.

El valor de las importaciones del producto alimenticio más importante para el campo nacional, atendiendo a su valor histórico y comercial, superó los 2,769 millones de dólares el año pasado, siendo Estados Unidos el principal proveedor del país y líder global en la siembra del cultivo (SIAP, 2012).

Aunque actualmente existe escasez de material genético que permita aumentar significativamente el rendimiento unitario, la producción de este cultivo depende muchas veces de genotipos criollos con bajo potencial de rendimiento y algunas características agronómicas no favorables para cubrir los requerimientos de la agricultura moderna, o bien, depende de semillas importadas no adaptadas a las condiciones ambientales regionales, aunado a los precios altos que limitan la accesibilidad por parte del agricultor de escasos recursos económicos (Pérez *et al.*, 1991).

Los fitomejoradores dedican muchos años para seleccionar y obtener progenitores sobresalientes.

El sistema de evaluación y selección temprana, consiste en un método de selección que permite identificar y seleccionar futuras líneas prometedoras, donde el fitomejorador tiene la oportunidad de seleccionar materiales genéticos de maíz de alto valor genético, con características agronómicas deseables que superen a los criollos, con capacidad de ser explotados bajo las condiciones regionales de adaptación y productividad (Márquez *et al.*, 1996).

8.1 Métodos

Lugar donde se desarrolló el experimento. El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Sanidad de Semillas y Biología Molecular, de la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Roque, Celaya, Guanajuato.

Material genético. La colecta de la población inicial fue de 600 materiales genéticos, provenientes de los estados de Morelos, Michoacán y Puebla; fueron seleccionados por sus características agronómicas sobresalientes; posteriormente, se derivaron familias de medios hermanos y se determinó que 169 familias fueron las más sobresalientes; se derivaron líneas S1 durante el ciclo 2009 y para el ciclo 2010 solamente se seleccionaron 80 líneas S1, las que se evaluaron para seleccionar genotipos que superaran en rendimiento a los maíces criollos.

A partir de esta evaluación, se derivaron líneas S2, las que se evaluaron para continuar con el proceso de formación de líneas endogámicas y comenzar a formar híbridos. Una vez obtenido el material biológico, se procedió a realizar la extracción de RNA del mismo.

Las líneas estudiadas fueron: Original, Línea Roque Rosas 1, Línea Roque Rosas 2, Línea 8, Línea 17, Línea 65, Línea 73 y Línea 81.

Extracción de DNA. EL proceso de extracción de DNA, necesario para el desarrollo del trabajo, fue el siguiente:

Se pusieron a germinar semillas de las líneas S2 seleccionadas en cajas de Petri para la producción de plántulas y obtener tejido vegetal. El tejido se congeló con nitrógeno líquido y se molió en un mortero. A la muestra obtenida se le agregó buffer de extracción de DNA de tejido vegetal (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, EDTA 20 mM, SDS 0.5%, Sarkosyl 2%, urea 5M).

Se mezcló con un vortex y al finalizar, se le agregó fenol (100 µl) – cloroformo (100 µl), se homogenizó y centrifugó por 5 min a 13,200 rpm. La fase acuosa se pasó a un tubo nuevo y se adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto pre-enfriado a -20 °C. Se mezcló por inversión y se incubó 30 minutos a -20 °C.

Se centrifugó por 5 min a máxima velocidad. Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70%. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar. Se suspendió la pastilla en agua tridestilada estéril y se disolvió. Se dejó en refrigeración a -40 °C.

Técnica de electroforesis en geles de agarosa. El DNA extraído de las plántulas, así como los productos obtenidos de todas las reacciones empleadas fueron confirmados mediante una electroforesis en geles de agarosa.

Se emplearon geles de agarosa al 2% en una solución de TAE. Las cantidades de muestra cargadas al gel fueron para DNA de plántulas 3 µl y para productos de PCR 5 µl, todas las muestras fueron cargadas con 3 µl de buffer de carga.

El marcador de pares de bases (bp) empleado fue generuler 100 bp DNA Ladder de FERMENTAS LIFE SCIENCES con una concentración de 0.1 µg/µl y se aplicaron al gel de agarosa 3 µl de este marcador.

Los geles se corrieron a 85 Volts, en una cámara para electroforesis de Accesolab. Para la visualización de las bandas los geles fueron teñidos con Bromuro de Etidio y observados con luz ultravioleta.

Amplificación por PCR. En tubos de microcentrifuga de 0.5 ml se mezclaron a una concentración final de los componentes mostrados en el tabla 8.

Tabla 8 Composición de mezcla para PCR

Componente	Cantidad (µl)
DNA templado	2
Buffer 10 x	5
dNTPs (2mM)	5
MgCl ₂ (50mM)	2
Taq polimerasa	.1
H ₂ O Tridestilada esteril	30.9
SSR primer	5
TOTAL	50

El pH del buffer de reacción fue de 8.3 medido a 25 °C. La amplificación de los ácidos nucleicos se llevó a cabo usando diferentes tiempos y temperaturas de desnaturalización, alineamiento y polimerización como se enlista en la tabla 8.1.

Tabla 8.1 Condiciones de amplificación en la reacción de PCR

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95 °C	5 min	1
Desnaturalización	94 °C	1 min	35
Alineación	55 °C	1 min 30 s	
Extensión	72 °C	1 min 30 s	
Extensión final	72 °C	10 min	1
Mantenimiento	4 °C	A	1

Al término de la reacción de amplificación, se agregó 1 μ l de RNasa para eliminar el exceso de RNA que dificulta la observación del ADN al correr el gel de agarosa.

Para la realización de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se empleó un termociclador marca TECHNE.

Se tomó una muestra de 13 μ l para analizar el producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 2%, tiñendo el gel con bromuro de etidio.

Para la generación de la matriz base para la generación del dendrograma, se empleó un set de primers SSR de maíz de la marca SIGMA-ALDRICH, con número de catálogo M 4193 el cual consiste de 384 pares de primers seleccionados de la base de datos del genoma del maíz. Los pares de primers fueron seleccionados para cubrir el genoma completo del maíz con un promedio de 20 cM, unidades de distancia en el mapa entre dos marcadores SSR.

Preparación de los primers SSR. Los primers se encuentran liofilizados en láminas de 96 pozos. Se procedió a hidratarlos, para lo que se empleó agua grado HPLC. Se preparó una solución a 10 μ M (10 pmole/ μ l) de cada primer adicionando 100 μ l de agua a cada pozo. Después de la reconstitución, se transfirió 25 μ l del primer a las placas de PCR del kit y se le agregó 75 μ l de agua para generar una solución de trabajo de 2.5 μ M. Se les colocó un cubierta para sellarlos y se almacenaron a -20°C. Antes de emplear las placas de PCR con solución de 2.5 μ M para el PCR, se centrifugaron brevemente para bajar el líquido que se condensa en el sello que cubre el pozo.

Dendrograma. El programa NTSYS-pc ver 2.1 (Numerical Taxonomy System for Personal Computer) es un programa de análisis estadístico multivariante específicamente diseñado para estudios de caracterización de germoplasma vegetal. Empleando el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average) y el coeficiente de Jaccard, dentro del programa, se generó un fenograma de la forma en que se agrupan las líneas estudiadas en base a los SSR (Rohlf, 1998).

8.2 Resultados y discusión

Productos de PCR. Una vez que se obtuvo el material vegetal, se realizaron las extracciones de ADN de cada muestra y se analizó su viabilidad, se procedió a realizar el PCR de cada una de las muestras. Con el protocolo de PCR indicado en la bibliografía se obtuvo una cantidad de producto adecuada para obtener una banda de correcta intensidad en un gel de agarosa al 2%. El polimorfismo se encuentra presente en la gran mayoría de los primers en cada una de las muestras, lo que nos indica que existe una gran variabilidad entre los mismos. Esto es un resultado esperado, al tener un grado de homocigosis bajo al ser S2.

Generación de matriz binaria. Una vez que se contó con las fotografías de las corridas de los productos de PCR se pudo proceder a crear una matriz de datos en la que se ordenaron los primers y materiales para establecer la presencia o ausencia de amplificación del fragmento del gen (bandas).

La tabla 8.3 muestra la forma en la que se ordenaron los datos para poder realizar el análisis de cluster.

Tabla 8.3 Matriz binaria de datos para los diferentes SSR de amplificación en las líneas de maíz Original, L17, L65, L73, L8, L81, LRR1 Y LRR2

MARCADOR	ORIGINAL	L17	L65	L73	L8	L81	LRR1	LRR2
p-umc 1354	1	1	1	0	0	0	0	0
p-umc 1566	0	0	0	0	0	0	0	0
p-umc 1292	1	1	1	0	1	1	0	1
p-bnlg 1124	1	1	0	1	0	0	1	1
p-bnlg 1179	1	1	1	0	1	1	0	1
p-bnlg 1014	1	1	1	1	1	1	1	1
p-umc 1685	1	1	1	1	1	1	1	1
p-umc 2225	0	0	0	0	0	1	0	0
p-bnlg 1429	1	1	1	0	0	1	1	1
p-umc 2226	0	1	1	0	0	1	0	0
p-bnlg 109	0	1	1	0	1	1	0	1
p-umc 1073	1	0	0	0	1	1	0	0
p-umc 1397	0	0	0	0	1	0	1	1
p-bnlg 2204	0	0	0	1	1	0	0	0
p-bnlg 2180	1	1	0	1	1	1	1	1
p-umc 1598	0	0	0	0	1	1	1	1
p-bnlg 2238	0	0	0	0	1	0	0	0
p-umc 1472	0	0	0	0	1	1	0	0
p-umc 1144	1	0	0	0	1	1	0	0
p-umc 2228	1	0	0	1	1	1	1	0
p-umc2184	0	1	0	0	0	0	0	0
p-bnlg1601	1	1	0	0	1	1	1	0
p-umc1641	0	1	1	0	1	1	1	0
p-bnlg1189	1	1	1	1	1	1	1	1
p-umc1573	0	1	0	0	1	0	1	0
p-umc1365	0	1	1	1	1	1	1	1
p-bnlg118	0	1	0	1	1	1	1	1
p-umc 2322	1	1	1	1	1	1	1	1
p-umc 1983	0	1	1	1	1	1	1	1
p-umc 1029	0	1	1	0	1	1	1	1
p-umc 2333	1	0	1	1	1	1	1	1
p-umc 1728	1	1	1	1	0	1	1	1
p-bnlg 1012	1	1	0	0	1	1	0	0
p-umc 1962	1	1	0	1	1	1	0	1

Análisis de matriz simétrica. En el caso de la matriz generada en este estudio, como se puede observar en el cuadro 4, las líneas con mayor grado de similitud son la L8 con la L81 y RR1 con RR2, con un coeficiente de 0.768 y 0.765, respectivamente, mientras que, por lo contrario, entre la L8 y L65 el coeficiente es de tan solo 0.471, lo que represente en valor más bajo de similitud.

De lo anterior se puede llegar a la conclusión de que el grado de parentesco entre L8 y L81 es muy alto, mientras que para L8 y L65 es bajo.

Tabla 8.4 Matriz simétrica de similitud generada de la matriz binaria basada en la presencia (1) o ausencia (0) de bandas específicas originadas en la amplificación de los SSR

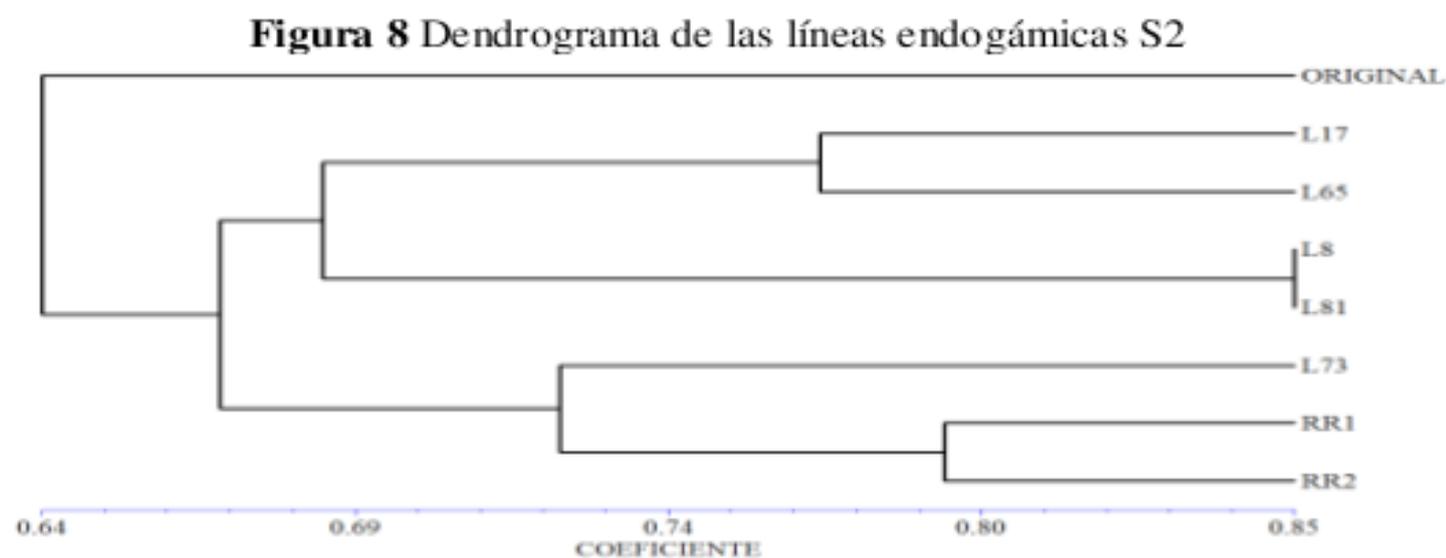
FILA\COLUMNA	ORIG	L17	L65	L73	L8	L81	RR1	RR2
ORIGINAL	1.000							
L17	0.617	1.000						
L65	0.588	0.735	1.000					
L73	0.647	0.559	0.588	1.000				
L8	0.529	0.559	0.471	0.529	1.000			
L81	0.647	0.676	0.647	0.529	0.768	1.000		
RR1	0.559	0.647	0.618	0.735	0.618	0.618	1.000	
RR2	0.618	0.7059	0.735	0.735	0.618	0.676	0.765	1.000

Dendrograma. A partir de la matriz binaria, se procedió a generar un fenograma mediante el programa NTSYS ver. 2 alimentando los datos dentro del mismo.

En la figura 8, se puede observar el fenograma obtenido utilizando el método de UPGMA. La agrupación de los materiales muestra la forma en la que se encuentra la distribución entre las líneas y la población original. De esto se puede inferir una relación filogenética entre las mismas.

Las Líneas 8 y 81 se pueden observar dentro de un mismo grupo por lo que se puede decir que tienen un grado de similitud alto. El agrupamiento de los materiales RR1 Y RR2 resultó de acuerdo a lo esperado según al origen de lo mismo, ya que ambos representan una misma población, solo variando la ubicación geográfica de su establecimiento.

Fenograma del análisis cluster de la distancia genética entre individuos de las líneas L17, L65, L8, L81 L73, RR1 y RR2 con respecto a la población original, empleando el coeficiente de similitud de Jaccard bajo el método UPGMA en el programa NTSYS-pc ver. 2.1.



Se puede observar una tendencia en la distribución de las líneas en dos grupos principales.

La genética es un punto muy importante en la historia del maíz, con grandes poblaciones experimentales combinadas con genotipos de bajo costo, para favorecer la investigación rigurosa de sus mecanismos genéticos. Se han logrado grandes avances en tan sólo los últimos años, pero aún quedan muchas preguntas por responder.

El objetivo del mejoramiento es hacer mejores combinaciones de alelos que están actualmente disponibles. Aun cuando los genetistas han tomado siempre ventaja de la recombinación para formar nuevas líneas, la pregunta ahora es como emplear el conocimiento moderno de genética molecular para además acelerar el proceso de mejoramiento. Parte de esto será determinar los factores que aumentan la tasa de recombinación. Otro aspecto es crear métodos para mejorar y/o seleccionar para la recombinación en regiones específicas para generar una nueva diversidad y reducir al mínimo la carga genética.

Muchos estudios indican que la dominancia y pseudo-sobredominancia son los mecanismos principales de la heterosis en el maíz, pero el grado en el que cada uno contribuye aún es incierto. La heterosis delinea mucho del mejoramiento moderno en el maíz, así que un entendimiento de sus mecanismos brinda el potencial para mejorar en gran medida la producción de maíz.

El costo de la genotipificación ha disminuido tanto en las décadas pasadas que ahora se encuentra entre las partes más baratas de un experimento. Actualmente muchos investigadores se concentran en la transferencia de fenotipos a genotipos como las bases para la selección debido al beneficio económico que representan la reducción del costo y aceleramiento del proceso de selección. Los primeros resultados de esta selección genómica son prometedores, pero aún existe mucho debate en el campo sobre si es la mejor metodología a emplear (Heslot *et al.*, 2012). De manera ideal, se puede considerar una comparación entre la selección genómica y la selección fenotípica estándar en un programa de mejoramiento, para evaluar su desempeño relativo y determinar que tan bien se mantiene la precisión predictiva en la práctica.

En última instancia, la genética cuantitativa del maíz tiene como objetivo mejorar el rendimiento de maíz para la agricultura. Los conocimientos adquiridos en el proceso pueden tener repercusiones más amplias. Debido a que el maíz ha heredado su arquitectura genética de una serie histórica de cruzamientos, su genética tiene al menos cierta semejanza con otras especies, incluyendo a los seres humanos.

8.3 Conclusiones

Se logró generar un dendrograma para observar la relación entre la población original y las líneas estudiadas mostrándose la existencia de polimorfismo en las líneas estudiadas. La matriz de similitud nos muestra la semejanza entre las líneas 8 y 81, así como para RR1 Y RR2.

Se requiere una cantidad mayor de marcadores para poder determinar una relación más clara entre las líneas endogámicas y la población original. Las líneas 73, RR1 Y RR2 poseen mayor variabilidad respecto a la población original. El nivel de la endogamia dentro de las líneas es bajo, por lo que aún no se fijan los caracteres por los que se seleccionaron los materiales, y las poblaciones no se agrupan por dichas cualidades. Se generó información necesaria para poder continuar con el análisis de estas líneas y se sentaron las bases para continuar con el incremento de nivel de endogamia que permita fijar los caracteres deseados.

8.4 Referencias

- Heslot N, Yang H-P, Sorrells ME, Jannink J-L (2012). Genomic selection in plant breeding: a comparison of models. *Crop Sci* 52: 146–160.
- Márquez S., F., L. Sahagún C., J. A. Carrera V., y E. Barrera G. 1996. Conservación y aprovechamiento de la diversidad racial total del maíz en México. In: Memoria XVI Congreso Nal. de la SOMEFI. Montecillo, Edo. de México. p. 183.
- Pérez, T. R. A.; Carballo, C. A.; Castillo, G. F. y Covarrubias, P. J. 1991. Identificación de patrones heteróticos en un grupo de variedades precoces de maíz. *Agrociencia serie Fitociencia* 2:69–79.
- Reyes C.P. (1990) El maíz y su cultivo. Primera edición. AGT Editor. México. 640 pp.
- Rohlf, F. J. 1998. NTSYS-PC, Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.60. Applied Biostatistics, New York.
- SIAP. 2009. Retos de la seguridad alimentaria y efectos del cambio climático. Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera. <http://www.siap.gob.mx>. Revisado el 3 de febrero de 2013.
- SIAP. 2012. Módulo Agrícola del SIACON 1980 - 2011. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <http://www.siap.gob.mx>. Revisado el 20 de febrero de 2013.