

UNIVERSIDAD LA SALLE
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS
INCORPORADA A LA UNAM



**"UTILIZACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES EN LA
CARTOGRAFÍA CROMOSÓMICA DEL MAÍZ (*Zea mays*, L.)
Y EN EL ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA
DEL MAÍZ TROPICAL Y DEL TEOCINTLE (*Zea luxurians*, L.)"**

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JUAN JOSÉ OLIVARES VILLEGAS

DIRECTOR DE TESIS: DIEGO ROBERTO GONZÁLEZ DE LEÓN E IBÁÑEZ

México, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1998

300627
2000

256094



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

La presente tesis de licenciatura fue aprobada por el Panel de Revisores y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PANEL DE REVISORES

DIRECTOR DE TESIS Y SECRETARIO DEL JURADO EXAMINADOR

Dr. Diego Roberto González de León e Ibáñez

PRESIDENTE DEL JURADO EXAMINADOR

QBP Guadalupe Morales Meza

VOCAL DEL JURADO EXAMINADOR

Dr. en C. José Domingo Méndez Francisco

SUPLENTE DEL JURADO EXAMINADOR

QFB Enrique Calderón García

SUPLENTE DEL JURADO EXAMINADOR

QFB Guadalupe Solís Chavarín

México D.F., octubre de mil novecientos noventa y ocho.

DEDICATORIA

A mi Mamá, por mostrarme las maravillas de la vida guiándome con su amor, comprensión y confianza, en esta lucha que ambos emprendimos.

A mi tía Eva, siempre enseñándome a mirar a las estrellas con sus sabios consejos y corazón materno inmenso, quien me brindó la oportunidad de que el conocimiento me iluminara.

A mi tío Víctor, quien como un padre ha escanciado su cariño, cuidados y enseñanzas vitales de nobleza y bondad impar.

Al Dr. Norman Borlaug, ejemplo a seguir de compromiso científico e integridad humana, siempre otorgándome su invaluable apoyo.

A Sofía, por la prístina alquimia del amor y el nutricional diálogo entre el arte y la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del Centro de Biotecnología Aplicada en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT, INT), por las facilidades otorgadas para el desarrollo y financiamiento de todas las fases del presente trabajo de investigación.

Al Dr. David Hoisington por otorgarme la única y valiosa oportunidad de efectuar la tesis de licenciatura en el centro que dirige, y permitirme interaccionar con una comunidad de científicos comprometidos con la aplicación de novedosas metodologías y conocimientos en el fitomejoramiento de países del tercer mundo.

Al Dr. Diego González de León, guía en el desciframiento de los inescrutables silogismos genéticos y maestro en esta iniciación científica, por su confianza invaluable y notable dirección de la tesis.

A los Dres. Mireille Khairallah, Jean-Marcel Ribaut, Susanne Groh y Robert McK. Bird por sus estimables consejos y por facilitarme datos fundamentales e información de las poblaciones y variedades sujetas a estudio cartográfico y al análisis de la diversidad genética.

Conste mi reconocimiento a todos los compañeros y colegas del Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del Centro de Biotecnología Aplicada, por su colaboración y el compartir conmigo sus artes.

Especial gratitud a los Dres. Antonio Serratos, Héctor Guillén, John Larsen y Enrico Perotti por los conciliábulos fraternos y enriquecedores comentarios al legajo.

A la Dra. Sarah Fennell, M. en C. Magdalena Salgado e I.Q. Rubiceli Hernández, por su total apoyo cuando balancéase el trabajo y la estulticia de la edición, y por enseñarme que la colaboración y el trabajo en equipo resultan en fructíferas experiencias.

A mis profesores, con especial cariño para la Profa. Q. Emma Argüero de Guerra por su apoyo absoluto e incondicional, así en los escabrosos avatares así en las luces de la licenciatura. Patente sea mi sincero aprecio para el QFB Enrique Calderón García, maestro de invaluable enseñanzas que sellan una visión particular de la farmacéutica.

Al panel de revisores asignados, por los pertinentes comentarios vertidos al *corpus* del escrito: QBP Guadalupe Morales Meza, Dr. en C. José Domingo Méndez Francisco, QFB Enrique Calderón García y QFB Guadalupe Solís Chavarín.

Al profesor Dr. José Antonio García, por la revisión del texto y atinadas sugerencias al mismo.

Por las cercanías del alma que denominanse amistad, sean Larissa, Chuyo, Sandino y Avelino.

Al Boss(†), fiel compañero en la procelosa travesía de los interminables océanos del insomnio.

A la Maga, sin cuya ayuda hubiese sido imposible la escritura del texto.

Para ciertas gentes (*sic*), el misterio empezaba precisamente con la explicación.

Julio Cortázar, *Rayuela*

And therefore as a stranger give it welcome./ There are more things in heaven and earth,/ Than
are dreamt of in your philosophy.

William Shakespeare, *Hamlet*

Sho the Platonic Year/Whirls out new right and wrong,/Whirls in the old instead;/All men are
dancers and their tread/Goes to the barbarous clangour of a gong.

W.B. Yeats, *The Tower*

Nous sommes quelques-uns à cette époque à avoir voulu attendre aux choses, créer en nous des
espaces à la vie, des espaces qui n'étaient pas et ne semblaient pas devoir trouver place dans
l'espace.

Antonin Artaud, *Le Pèse-nerfs*

i. RELACIÓN DE TABLAS.....	ix
ii. RELACIÓN DE FIGURAS.....	x
iii. RESUMEN/SUMMARY.....	xiii
OBJETIVO GLOBAL, OBJETIVOS ESPECÍFICOS, JUSTIFICACIÓN.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	xv
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
1- FITOMEJORAMIENTO Y MARCADORES.....	2
1.1 Clases de marcadores existentes.....	2
1.1.1 Marcadores moleculares.....	3
1.2 Comparación de técnicas de marcaje molecular.....	4
1.3 Requerimientos de los marcadores para las aplicaciones en el fitomejoramiento.....	7
2- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	7
2.1 Edificio teórico.....	7
2.2 Parámetros de la PCR.....	7
2.2.1 Ciclos térmicos.....	8
2.2.2 ADN patrón (o sustrato).....	8
2.2.3 Concentración de enzimas.....	10
2.2.4 Iniciadores.....	11
2.2.4.1 Diseño.....	12
2.2.4.2 Estabilidad interna.....	13
2.2.4.3 Temperatura de fusión (<i>melting temperature, T_m</i>).....	13
2.2.4.4 Cálculo de la concentración.....	14
2.2.4.5 Marcaje.....	15
2.2.5 Trifosfatos de desoxinucleótidos (<i>dNTPs</i>).....	15
2.2.6 Promotores e inhibidores de la PCR.....	16
2.2.7 Aparatos.....	16
3- SECUENCIAS DE REPETICIÓN EN EL ADN.....	18
3.1 ADN repetitivo.....	18
3.2 Secuencias sin función conocida.....	18
3.3 ADN satélite.....	20
3.4 <i>Loci</i> del número variable de repeticiones en tándem o minisatélites.....	21
4- MICROSATÉLITES.....	22
4.1 Edificio teórico.....	22
4.1.1 Reglas de designación.....	22
4.1.2 Distribución genómica.....	23
4.1.3 Función.....	23
4.1.4 Origen.....	25
4.2 Evaluaciones experimentales.....	26
4.2.1 Desarrollo de iniciadores.....	27
5- APLICACIONES DE LOS MICROSATÉLITES.....	29
5.1 Cartografía.....	29
5.1.1 Consideraciones teóricas.....	29
5.1.2 Elementos para un proyecto cartográfico.....	30
5.1.3 Análisis del ligamiento genético.....	33
5.1.3.1 Distribución χ^2	33
5.1.3.2 Prueba de <i>LOD score</i>	34

5.1.4	Análisis multipuntual.....	
5.1.4.1	Análisis bipuntual.....	35
5.1.4.2	Análisis de tres puntos.....	36
5.1.4.3	Análisis de <i>m</i> puntos.....	36
5.1.5	Funciones cartográficas.....	37
5.1.5.1	Función de Haldane.....	37
5.1.5.2	Función de Kosambi.....	38
5.2	Diversidad genética del maíz tropical y subtropical.....	40
5.2.1	Consideraciones generales.....	40
5.2.1.1	Maíz (<i>Zea mays</i> , L.).....	40
5.2.1.2	Teocintle (<i>Zea luxurians</i> , L.).....	40
5.2.2	Estudios de la diversidad genética.....	40
5.2.2.1	Marcadores morfológicos.....	41
5.2.2.2	Estudios citológicos.....	41
5.2.2.3	Marcadores bioquímicos (isoenzimas).....	41
5.2.2.4	Marcadores moleculares.....	41
5.2.2.4.1	Microsatélites.....	42

MATERIALES Y MÉTODOS

1-	ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	44
1.1	Determinación de parámetros.....	44
1.1.1	Reacción en cadena de la polimerasa.....	45
1.1.2	Temperaturas de ensamblaje.....	45
1.1.3	Electroforesis y detección.....	46
2-	ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN SECUENCIAS MICROSATÉLITES.....	47
2.1	Cartografía.....	47
2.2	Diversidad genética del maíz tropical (<i>Zea mays</i> , L.) y subtropical (<i>Zea luxurians</i> , L.).....	47
3-	CARTOGRAFÍA.....	49
3.1	Establecimiento del polimorfismo microsatélite.....	49
3.2	Estudio del polimorfismo de las poblaciones en segregación.....	49
3.3	Construcción de los mapas de ligamiento genético.....	51
4-	ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL MAÍZ TROPICAL Y SUBTROPICAL.....	52
4.1	Material vegetal.....	52
4.2	Mezcla (<i>bulking</i>) de muestras.....	53
4.3	Lectura de bandas y coeficientes de similaridad.....	54
4.4	Análisis de conglomerados.....	55
4.5	Análisis de componentes principales (ACP).....	56

RESULTADOS

1-	ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	58
1.1	Determinación de parámetros.....	58
1.1.1	Reacción en cadena de la polimerasa.....	58
1.1.2	Temperaturas de ensamblaje.....	58
1.1.3	Electroforesis y detección.....	58
2-	CARTOGRAFÍA.....	60
2.1	Establecimiento del polimorfismo microsatélite.....	60
2.2	Estudio de las poblaciones en segregación F_2 y RIL.....	60
2.3	Construcción de los mapas de ligamiento genético.....	67
3-	ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL MAÍZ TROPICAL Y SUBTROPICAL.....	72
3.1	Lectura de bandas y polimorfismo.....	72
3.2	Mezcla (<i>bulking</i>) de muestras.....	72
3.3	Coefficientes de similaridad y análisis de conglomerados.....	74
3.4	Análisis de componentes principales (ACP).....	76

DISCUSIÓN

1- ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	79
1.1 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS.....	79
1.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa y temperaturas de ensamblaje	79
1.1.2 Electroforesis y detección	79
2- CARTOGRAFÍA	79
2.1 Estudio del polimorfismo microsatélite en las poblaciones en segregación F_2 y <i>RIL</i>	79
2.2 Construcción de los mapas de ligamiento genético	80
3- ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL MAÍZ TROPICAL Y SUBTROPICAL.....	81
3.1 Datos, lectura y número de marcadores	81
3.2 Estudios de conglomerados y ACP.....	81
3.3 Mezcla (<i>bulking</i>) de muestras.....	82

CONCLUSIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXO	102

Tabla 1. Resumen comparativo de las propiedades y requerimientos tecnológicos de distintas metodologías de marcaje molecular.....	5
Tabla 2. Polimerasas termoestables del ADN y fuentes de origen.	11
Tabla 3. Propiedades de las polimerasas del ADN comúnmente usadas en PCR.	12
Tabla 4. Promotores e inhibidores de la PCR.....	16
Tabla 5. Número y distancias promedio entre microsatélites en especies vegetales (Megapares de bases/Genoma Haploide, Mpb/C).....	24
Tabla 6. Distribución de microsatélites respecto a secuencias de codificación.	24
Tabla 7. Tipos de población, clases de marcadores, cocientes de segregación y clases de órdenes posibles.....	37
Tabla 8. Optimización de los parámetros de la PCR.	44
Tabla 9. Diseño de programas para la PCR en termociclador ERICOMP®.	45
Tabla 10. Selección de la concentración apropiada en dos sistemas de geles (agarosa y poliacrilamida) para la separación de productos de PCR.	46
Tabla 11. Relación general de los iniciadores microsatélites utilizados en los estudios de polimorfismo genético.	48
Tabla 12. Resumen de características de los progenitores de maíz.	50
Tabla 13. Relación del material vegetal utilizado en estudios de polimorfismo en secuencias microsatélite entre cruza seleccionadas.	50
Tabla 14. Maíces tropicales y teocintles (<i>Zea mays</i> , L. y <i>Zea luxurians</i> , L.) utilizados en el estudio de polimorfismo en secuencias microsatélites.	53
Tabla 15. Optimización de los parámetros de la PCR.	58
Tabla 16. Resultados del estudio de temperatura óptima, calidad de banda y polimorfismo para B73, Mo17 y CML247.....	59
Tabla 17. Estudio de la calidad de banda y polimorfismo de iniciadores microsatélites con un panel seleccionado de progenitores de maíz (<i>Zea mays</i> , L.).	61
Tabla 18. Polimorfismo genético. Cruzas, individuos seleccionados e iniciadores microsatélites.....	65
Tabla 19. Segregación observada y significancia en el análisis de distribución de χ^2 para los <i>loci</i> microsatélites en poblaciones F ₂ y RIL de maíz.	66
Tabla 20. Resultados cartográficos RFLP-SSR.	67

- Figura 1. Representación gráfica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sean n ciclos = 2^n moléculas. Si $n=40$, 1 molécula es amplificable $2^{40} = 10^{12}$ veces. Los amplicones resultantes del segundo ciclo, que sirven como sustrato para el ciclo de reacción subsecuente, darán un producto definido (Modificación a González-de-León *et al.* 1995).9
- Figura 2. Curva hipotética del C_0t de una molécula de ADN que, previamente a la fragmentación (separación por densidad y masa molecular en función de los cocientes de sedimentación, cuando se somete el ADN a ultracentrifugación) era de 2×10^6 pb de longitud y consistía de una secuencia única de 1×10^6 pb y 1000 copias de una secuencia de 1000 pb. Nótese la naturaleza bifásica de la curva (Voet y Voet 1990).19
- Figura 3. Clasificaciones del ADN eucariótico (modificación a Griffiths *et al.* 1996).19
- Figura 4. Gráfica que ilustra el patrón de la densidad de ADN de *Drosophila virilis*, centrifugado al equilibrio en CsCl neutro. Tres bandas de ADN satélite ($\rho = 1.692, 1.688, \text{ y } 1.671$) están presentes, adicionales a la banda principal ($\rho = 1.70$) (tomado de Voet y Voet 1990).20
- Figura 5. Representación esquemática de una secuencia microsátélite y regiones flanco (modificación a González-de-León *et al.* 1995; Griffiths *et al.* 1996).22
- Figura 6. Generación y visualización de los polimorfismos de longitud de las repeticiones de secuencia simple (modificación a Cregan 1992).26
- Figura 7. Esquema de las poblaciones sujetas a cartografía cromosómica, donde se muestran los genotipos (entre paréntesis) (Modificación a González-de-León *et al.* 1995).32
- Figura 8. Cociente del error estándar de la frecuencia de recombinación (s_e/r) en una retrocruza. Para los valores "más factibles" de r (frecuencia de recombinación), se calcula un cociente muy grande ($n = 100$); se aumenta cuando el tamaño n de la población disminuye ($n = 50$) (Lorieux 1994).33
- Figura 9. Esquema de posibles combinaciones de tres loci (A, B y C). Considerando que las distancias de mapa son aditivas, el cálculo de las distancias A-B A-C y B-C permitiría la posibilidad ejemplificada por la distancia B-C (Griffiths *et al.* 1996).36
- Figura 10. Diagrama que representa la ubicación hipotética de tres loci. Esto es, de cartografiarse tres loci adyacentes A, B y C, el cálculo de la distancia (en función de la frecuencia de recombinación) para el intervalo A-B, y de aquel para B-C no será, generalmente, igual al estimado para A-C (Lorieux 1994; González-de-León *et al.* 1995).38
- Figura 11. Relación entre la frecuencia de recombinación entre dos loci y la distancia genética, calculadas con dos de las funciones cartográficas más utilizadas: aquellas de Haldane y Kosambi. La función de Kosambi brinda un mapa "más compacto" que el de Haldane (Lorieux 1994).39

Figura 12. Criba de polimorfismo en panel de progenitores de maíz (<i>Zea mays</i> , L.) con iniciadores <i>mz-adh2</i> y <i>gpc1</i> . Identificación de carriles: M, ϕ X174/ <i>Hae</i> III; 1, Ki3, 2, CML139; 3, CML131; 4, CML67; 5, CML204; 6, P42; 7, P48; 8, CML247; 9, 3T; 10, 5T; 11, 18B; 12, 20B.	62
Figura 13. Criba de polimorfismo en panel de progenitores de maíz (<i>Zea mays</i> , L.) con iniciadores <i>phi085</i> y <i>phi075</i> . Identificación de carriles: M, ϕ X174/ <i>Hae</i> III; 1, Ki3, 2, CML139; 3, CML131; 4, CML67; 5, CML204; 6, P42; 7, P48; 8, CML247; 9, 3T; 10, 5T; 11, 18B; 12, 20B.	62
Figura 14. Polimorfismo microsatélite en población F_2 de la cruce P42xP48 de maíz (<i>Zea mays</i> , L.), con iniciador <i>phi085</i> . Identificación de carriles en gel de agarosa al 3%: M, ϕ X174/ <i>Hae</i> III; A, P42, B, P48; y algunas muestras de la población.	63
Figura 15. Polimorfismo microsatélite en población F_2 de la cruce P42xCML247 de maíz (<i>Zea mays</i> , L.), con iniciador <i>phi031</i> . Identificación de carriles en gel de agarosa al 3%: M, ϕ X174/ <i>Hae</i> III; A, P42, B, CML247; y algunas muestras de la población.	63
Figura 16. Polimorfismo microsatélite en población F_2 de la cruce Ki3xCML139 de maíz (<i>Zea mays</i> , L.), con iniciador <i>phi083</i> . Identificación de carriles en gel de poliacrilamida al 6%: M, ϕ X174/ <i>Hae</i> III; A, Ki3, B, CML139; y algunas muestras de la población.	64
Figura 17. Polimorfismo microsatélite en población RIL de la cruce CML67xCML131 de maíz (<i>Zea mays</i> , L.), con iniciador <i>phi082</i> . Identificación de carriles en gel de poliacrilamida al 6%: M, ϕ X174/ <i>Hae</i> III; A, CML67, B, CML131; y algunas muestras de la población.	64
Figura 18. Mapa de ligamiento RFLP-SSR: Ac7643- <i>ss</i> x Ac7729/TZRW- <i>ss</i>	68
Figura 19. Mapa de ligamiento RFLP-SSR: Ac7643- <i>ss</i> x CML247.	69
Figura 20. Mapa de ligamiento RFLP-SSR: Ki3 x CML139.	70
Figura 21. Mapa de ligamiento RFLP-SSR: CML67 x CML131.	71
Figura 22. Polimorfismo microsatélite con iniciador <i>mz-adh2</i> . Identificación de carriles en gel de poliacrilamida al 6%: M, ϕ X174/ <i>Hae</i> III; controles: A, Mo17, B, CML247; C, B73. <i>Zea luxurians</i> : Za, NicaraguaA, Zb, NicaraguaB; Zg, Guatemala. Se presentan los números correspondientes a las muestras de accesiones de maíz tropical y los grupos de Veracruz141: α , β y χ	73
Figura 23. Polimorfismo microsatélite con iniciador <i>gpc1</i> . Identificación de carriles en gel de poliacrilamida al 6%: M, ϕ X174/ <i>Hae</i> III; controles: A, Mo17, B, CML247; C, B73. <i>Zea luxurians</i> : Za, NicaraguaA, Zb, NicaraguaB; Zg, Guatemala. Se presentan los números correspondientes a las muestras de accesiones de maíz tropical y los grupos de Veracruz141: α , β y χ	73

Figura 24. Polimorfismo microsatélite con iniciador <i>p/ii001</i> . Identificación de carriles en gel de poliacrilamida al 6%: M, ϕ X174/ <i>Hae</i> III; controles: A, Mo17, B, CML247; C, B73. <i>Zea luxurians</i> : Za, NicaraguaA, Zb, NicaraguaB; Zg, Guatemala. Se presentan los números correspondientes a las muestras de accesiones de maíz tropical y los grupos de Veracruz141: α , β y χ	73
Figura 25. Dendrogramas de los resultados de los análisis de conglomerados sobre las matrices de diferencias calculadas por el coeficiente de similitud s_5 , derivadas de comparaciones <i>pairwise</i> para los conjuntos matriciales de datos "a" (1), "ab" (2) y "abc" (3).	75
Figura 26. Análisis de Componentes Principales (ACP) del estudio de diversidad genética con marcadores microsatélites de 17 accesiones de maíz tropical y subtropical para las matrices de datos "a", "ab" y "abc", utilizando el coeficiente de similitud s_5 y la función de supresión <i>pairwise</i> . ..	77

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se exploraron las aplicaciones de los microsatélites (o secuencias simples de repetición) en el estudio de la genética molecular aplicada del maíz tropical (*Zea mays*, L.) y del teocintle (*Zea luxurians*, L.): la cartografía cromosómica y el análisis de la diversidad genética.

El estudio cartográfico requirió del escrutinio de polimorfismos (circa 86%) con 42 iniciadores microsatélites en un panel de 13 cultivares de maíz, previamente utilizados en proyectos cartográficos con marcadores RFLP en el Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT, INT. Las poblaciones F_2 (P42xP48, P42xCML247 y Ki3xCML139) y *RIL* (CML131xCML67) seleccionadas se analizaron por muestreo relativo (5-12% del total de las progenies), revelando segregación codominante mendeliana. Las pruebas de χ^2 demostraron que sólo 9 loci se desviaron de manera significativa de los cocientes de segregación mendeliana: 7 loci en las poblaciones F_2 y 2 en la población *RIL*.

La construcción de los mapas de ligamiento genético se realizó sobre una infraestructura con marcadores RFLP mediante la función de recombinación de Haldane, con valores cartográficos de $LOD \geq 3.0$ y θ (*theta*) ≤ 0.4 . En suma, se ubicaron 31 loci microsatélites en los diferentes mapas de ligamiento.

El análisis de la diversidad genética requirió del estudio de 12 accesiones del complejo racial Tuxpeño y 2 teocintles, así como de 3 líneas control (dos de la "Faja Maicera", y una línea de maíz tropical); todos analizados con 14 microsatélites. Primordialmente, fueron razones de orden germoplásmico las que se elucidaron en la formación de conglomerados, con referencia en estudios producidos a partir de determinaciones morfoagronómicas (Taba *et al.* 1994). Las matrices de datos generadas se analizaron con coeficientes de similitudes *s5* (coeficiente de Anderberg) y supresiones *pairwise*. Al ser representadas por clasificaciones jerárquicas aglomerativas, se definieron en cuatro grupos para el orden de alelos de mayor intensidad y seis para los órdenes de mediana y baja resolución. Los valores que explicaron los primeros cuatro componentes en cuanto a la varianza total fueron disímbolos. En general, los resultados del análisis de componentes principales fueron congruentes con aquellos de los conglomerados.

SUMMARY

Chromosome mapping and genetic diversity analyses were performed utilising microsatellites on tropical maize (*Zea mays*, L.) and teosinte (*Zea luxurians*, L.). Mapping required polymorphisms screening on a 13 maize cultivars panel, previously studied in RFLP mapping projects conducted at the Applied Molecular Genetics Laboratory, sited at CIMMYT, INT. F_2 (P42xP48, P42xCML247 and Ki3xCML139) and *RIL* (CML131xCML67) populations were analysed by relative sampling (5-12% from the total progenies), revealing mendelian codominant segregation. χ^2 tests showed significant deviation from mendelian segregation ratios for 9 loci: 7 in F_2 and 2 on the *RIL*.

Genetic linkage maps were built onto a RFLP marker infrastructure using Haldane recombination function, having as mapping values those of $LOD \geq 3.0$ and θ (*theta*) ≤ 0.4 . Location of 31 microsatellite loci in the different linkage maps was accomplished.

Genetic diversity analyses were based on 12 Tuxpeño racial complex accesions, 2 teosintes, and 3 control lines (two "Corn Belt", and a tropical one); all analysed with 14 microsatellites. Essentially, clustering was directed by germoplasmic evidence derived from morphoagronomic data (Taba *et al.* 1994). Data matrixes generated were studied through *s5* Anderberg coefficients and *pairwise* deletions. Four groups were defined for the high intensity alleles, whilst six were identified for the medium and low intensities. Values which explained the first four components for the total variance were found to be deviant. In general, principal component analysis results agreed with those of the clustering ones.

OBJETIVO GLOBAL

Demostrar la utilidad de la metodología de los marcadores moleculares microsatélites en dos áreas importantes de la genética del maíz (*Zea mays*, L.): la cartografía cromosómica y el análisis de la diversidad genética entre éste y el teocintle (*Zea luxurians*, L.).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar el polimorfismo genético existente en un panel de cultivares progenitores de maíz (*Zea mays*, L.), haciendo uso de los marcadores moleculares microsatélites.
- Verificar la herencia de los polimorfismos detectados en poblaciones segregantes mediante los microsatélites.
- Integrar los *loci* microsatélites identificados en diferentes mapas de ligamiento genético preexistentes.
- Explorar el potencial de los microsatélites en el estudio y descripción de la diversidad genética entre determinados cultivares y accesiones de maíz tropical (*Zea mays*, L.) y el teocintle (*Zea luxurians*, L.).

JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo de tesis es una investigación de ciertas aplicaciones de los microsatélites (o secuencias simples de repetición) como marcadores moleculares en el vasto edificio de la genética del maíz (*Zea mays*, L.). Tales metodologías de marcaje permiten analizar, con alta sensibilidad, polimorfismos o variaciones en secuencias genómicas específicas, independientemente de las interacciones genotipo-ambiente. Son abundantes en el genoma y presentan uniformidad en su distribución. Comprobadamente, registran herencia mendeliana y segregación de orden codominante; son específicos para un *locus* o sitio cromosómico, siendo posible detectar varios alelos por *locus*. Han significado un gran impacto en dos importantes áreas de la genética molecular aplicada del maíz: la cartografía cromosómica y el análisis de la diversidad genética.

Considerado lo anterior, cabe preguntarse si los microsatélites tienen similar utilidad en el estudio del maíz tropical como sistema biológico que con maíz de zonas templadas, en particular. Para tal efecto, resulta necesario demostrar la factibilidad de establecer experimentalmente los parámetros técnicos que exige reproducir resultados confiables con estos marcadores. Consecuentemente, es de interés comprobar la utilidad relativa de la metodología en la incorporación y complementación de los datos obtenidos en la infraestructura molecular en estudios previos de cartografía cromosómica efectuados con otros marcadores (en este caso, los RFLPs); así como su condición de auxiliar para el análisis de la diversidad genética. Finalmente, resaltar el estatus de esta investigación como meramente ilustrativa de las posibilidades de este sistema (solo o en conjunción con otros) para un mejor conocimiento de la genética del maíz.

INTRODUCCIÓN

La historia humana se sustenta en la domesticación, cultivo, mejoramiento y aprovechamiento de especies vegetales. La civilización y la agricultura se encuentran indisolublemente relacionados; no se concibe una sin la otra. Desde el comienzo del desarrollo de la agricultura (ca. 7000 a.C.) (Hayes e Immer 1942; Wellhausen *et al.* 1951; Welsh 1981; Doebley 1990b; Castillo-González 1994), el hombre se ha entregado a la domesticación, cuidado, selección y mejoramiento de cultivos para conservar o perfeccionar determinados caracteres de las plantas que le son de importancia nutricional, ornamental, económica o religiosa.

El fitomejoramiento es una ciencia aplicada cuyos propósitos fundamentales son obtener y producir cultivares o híbridos vegetales que brinden productos de alta calidad por unidad de área cultivada, caracterizados por su resistencia y/o tolerancia a especies patógenas, capaces de soportar estreses abióticos y bióticos; e, implementar sistemas de producción eficientes en función de las necesidades particulares del agricultor y del consumidor.

En esencia, el fitomejoramiento estudia y utiliza una amplia gama de caracteres, ya *cuantitativos* ya *cualitativos*. Los mecanismos que regulan la herencia de caracteres de generación en generación pueden explicarse por los principios de la genética mendeliana —principio de segregación independiente, principio de distribución independiente— (East y Hayes 1911; Emerson y East 1913). Sin embargo, restan innumerables interrogantes, entre las que se consideran:

- a) la contribución e incidencia del número de *loci* genéticos en la expresión de los caracteres;
- b) la ubicación cromosómica de tales *loci*; y,
- c) el tamaño relativo de la contribución de cada *locus* a la expresión de un(os) caracter(es).

El advenimiento de novedosas técnicas fundamentadas en marcadores moleculares supone el estudio indirecto de los sistemas biológicos y químicos que regulan la expresión o supresión de caracteres, con objeto de proveer a los científicos, fitomejoradores y genetistas de poderosos métodos para la cartografía y manipulación individual del *locus* (o de los *loci*) asociado(s) con la expresión de tales rasgos o caracteres. El uso efectivo de marcadores genéticos, aunado a las prácticas tradicionales, permitirá logros y avances significativos en las estrategias de fitomejoramiento, selección vegetal, genética cuantitativa, así como en estudios de la diversidad genética.

Las repeticiones de secuencia simple o microsatélites son novedosos marcadores moleculares que, por sus características *per se* (alto polimorfismo, herencia, distribución genómica, eficiencia experimental), adquieren importancia creciente por su aplicación en estudios de cartografía vegetal, análisis de germoplasma y de diversidad intra e inter poblacional, identificación de cultivares o en el escrutinio de caracteres cuantitativos (Shattuck-Eidens *et al.* 1990, Morgante y Olivieri 1993, Rafalski y Tingey 1993, Ribaut *et al.* 1997).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1- FITOMEJORAMIENTO Y MARCADORES

El fitomejoramiento tradicional involucra el cruzamiento repetido de grandes números de plantas con características deseables (p.e., rendimiento, resistencia a enfermedades y plagas, tolerancia a sequía, etc.), confiando que tales características puedan ser combinadas de manera estable en un solo germoplasma. Emplea rasgos o marcadores fenotípicos, morfológicos o fenológicos para efectuar la selección de individuos, líneas o cultivares. Sin embargo, no existe con frecuencia una relación clara entre el genotipo y el fenotipo. Tal desventaja puede eludirse mediante el uso de marcadores bioquímicos y moleculares, puesto que poseen un control genético mendeliano, permiten evaluar la variación genética —en función de la mutación, la selección o la deriva genética—, y representan una muestra de la variación a nivel del ADN, con lo que se obvia el efecto ambiental.

1.1 Clases de marcadores existentes

Un marcador es considerado como un carácter cuyo patrón de herencia puede definirse en un nivel morfológico o fenotípico, bioquímico o molecular. Se le utiliza para obtener, aunque de manera indirecta, información con respecto de las bases genéticas de otros caracteres o rasgos de interés en el organismo sujeto a estudio. *Strictu sensu*, se asocian marcadores con caracteres.

Las investigaciones iniciales de la herencia de caracteres se condujeron en función de caracteres morfológicos (Dudley 1993), los cuales son profundamente afectados por fluctuaciones ambientales y por las etapas de desarrollo de la planta, así como por el vasto número de individuos a analizar (Wang y Tanksley 1989). Así, surgió la idea de utilizar marcadores genéticos para esclarecer la probabilidad de relación entre un *locus*¹ genético y un carácter determinado.

Los primeros sistemas de marcadores (no fenotípicos) disponibles en plantas fueron aquellos desarrollados a partir de la electroforesis de polipéptidos: isoenzimas o aloenzimas, y proteínas de reserva de semilla (Crawford 1990; Voet y Voet 1990). El término isoenzima comprende una multiplicidad de enzimas con actividad catalítica similar (en una sola especie), pero con diferentes formas moleculares (Markert y Moller 1959). Este tipo de enzimas difieren en su estructura química y, en consecuencia, en algunas de sus propiedades, pues se encuentran codificadas por distintos genes (que pueden ubicarse en diferentes *loci*²) o por diferentes alelos en un mismo *locus* (IUPAC-IUB 1977); aquellas isoenzimas que se originan a partir de las mutaciones de formas en el mismo *locus* se denominan aleloenzimas o aloenzimas (Vladutiu y Vladutiu 1991). Se identifican a las isoenzimas como marcadores bioquímicos por su naturaleza proteínica, mas pueden considerarse como marcadores genotípicos si se labora bajo condiciones estandarizadas; permiten comprender ciertos procesos genéticos (p.e., la transformación de un gen en otro), la regulación de la expresión de genes, el impacto bioquímico de las modificaciones sobre las rutas metabólicas en diferentes tejidos, y la asociación de la codificación de un determinado polipéptido con ciertos caracteres fenotípicos (Vladutiu y Vladutiu 1991; Tsegaye *et al.* 1996); han sido ampliamente usadas en la caracterización de germoplasma (Kahler y Lay 1985), en el estudio de la variación proteínica e isoenzimática (Goodman *et al.* 1980; Wendel *et al.* 1986); en la evaluación de la variación genética en poblaciones (Frei *et al.* 1986); y, en la filogenia entre géneros y especies (Asins y Carbonell 1986).

¹ Un *locus* es la posición o sitio en un cromosoma que ocupa un gen o una secuencia del ADN, representando un carácter en particular.

² *Loci*, voz latina que indica el plural de *locus*.

Si bien los estudios isoenzimáticos han sido sumamente útiles en el análisis molecular vegetal, existen varias restricciones con respecto de su uso: el escrutinio de un número limitado de *loci*; la imposibilidad de establecer con acuciosidad la variación cuantitativa de un *locus* determinado; y, una alta especificidad de los datos obtenidos en cuanto a tejido y etapa de desarrollo de la planta.

1.1.1 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares o marcadores del ADN se entienden como regiones o segmentos del ADN cuya función codificadora generalmente se desconoce, pudiéndose ubicar en las inmediaciones de un gen³ y determinar un carácter de interés agronómico que sea sujeto de escrutinio en cruza genéticas (Tanksley 1983).

Al asociar un marcador con un determinado *locus* es posible verificar con gran precisión la segregación de los alelos⁴ que se ubican en tal *locus* (Rieger *et al.* 1976).

La distribución uniforme de estos marcadores a todo lo largo del genoma ha permitido su uso en estimaciones de la contribución genética de cada progenitor a cada miembro de una población segregante. De tal manera, ha sido posible emplear los polimorfismos⁵ de secuencia entre individuos para la cartografía genética. Consecuentemente, se han transformado de manera radical el estudio y la práctica de la genética.

En general, las ventajas relativas de los marcadores moleculares sobre los marcadores morfológicos para la mayoría de las aplicaciones genéticas y de mejoramiento (Beckmann y Soller 1983; Tanksley 1983; Tanksley *et al.* 1989; Stuber 1992; Gepts 1994; Richardson *et al.* 1995), son:

1. La mayoría de los marcadores morfológicos sólo pueden evaluarse en el nivel del conjunto de la planta —frecuentemente, en fase de maduración—. En cambio, con los marcadores moleculares sólo se necesitan muestras celulares o tisulares para el análisis de los genotipos.
2. Con marcadores morfológicos es posible verificar alelos mediante la inducción o aplicación de mutágenos exógenos. Para la mayoría de las especies vegetales, diversos alelos que aparecen de manera natural pueden identificarse en la mayoría de los *loci* marcados molecularmente.
3. Usualmente no existe asociación alguna de efectos dañinos con alelos de marcadores moleculares. Tal no acontece con los marcadores morfológicos, los cuales están acompañados de efectos fenotípicos indeseados.
4. Las interacciones de dominancia-recesividad entre alelos impiden (con regularidad) discernir todos los genotipos asociados con los caracteres morfológicos. Los alelos en la casi totalidad de los *loci* marcados molecularmente se comportan de una manera codominante, lo que permite identificar todos los posibles genotipos en cualquier generación en segregación.

³ Un gen se define, en genética, como la unidad física y funcional de la herencia; molecularmente, se considera como una secuencia definida del ADN que codifica, parcial o totalmente, un producto genético (polipéptido, ARN, etc.) (Rieger *et al.* 1976; Watson *et al.* 1987; González-de-León *et al.* 1995).

⁴ Forma alternativa de un gen que ocupa el mismo *locus* en un cromosoma en particular o en una misma estructura de ligamiento (Rieger *et al.* 1976).

⁵ Aparición (léase verificación) regular y simultánea en la misma población sujeta a análisis de uno o más alelos en un *locus*, o la observación de dos o más variantes discontinuas o genotipos (o morfos, formas), con al menos una frecuencia >1%; los cuales no son ocasionados por mutación recurrente (morfismo) (Rieger *et al.* 1976).

5. En cuanto a los marcadores morfológicos respecta, las interacciones epistáticas desfavorables a menudo aparecen entre los alelos que codifican para los caracteres marcados morfológicamente y limitan en gran medida el número de marcadores en segregación que pueden monitorearse en una sola población. La amplia mayoría de los marcadores moleculares parecen estar libres de efectos epistáticos; por lo tanto, el número de *loci* a escrutinizar en un sola población es teóricamente ilimitado.

1.2 Comparación de técnicas de marcaje molecular

El desarrollo de las técnicas moleculares de marcaje es relativamente reciente (Beckmann y Soller 1983; Tanksley 1983; Helentjaris *et al.* 1985; Morgante y Olivieri 1993; Rafalski y Tingey 1993; Gepts 1994; Kochert 1994). Poseen características específicas y varían en requerimientos técnicos y experimentales (Tabla 1). De entre tales técnicas sobresalen:

- I. Los marcadores RFLP⁶. Este tipo de marcadores polimórficos presentan codominancia alélica, se encuentran en un número casi ilimitado, y (aparentemente) no son afectados por la epistasis (González-de-León *et al.* 1995). La metodología consiste en varios pasos: digestión del ADN con enzimas de restricción, electroforesis en gel, transferencia de los fragmentos desnaturalizados de ADN a una membrana de nilón (*nylon*, en inglés), hibridación de una sonda⁷ (previamente marcada) con las secuencias genómicas complementarias, y detección de las sondas. Consecuentemente, el polimorfismo se interpreta como la variación en la longitud de los fragmentos del ADN escindido por las enzimas de restricción y en la hibridación específica de la sonda. Son considerados clásicos tanto por los extensos estudios efectuados en una amplia variedad de especies vegetales, como por la consistencia de la técnica (Tanksley 1983; Helentjaris *et al.* 1985, 1988; Evola *et al.* 1986; Helentjaris 1987; Landry *et al.* 1987; Burr *et al.* 1988; Tanksley y Hewitt 1988; Hoisington 1989; Sharp *et al.* 1989; Huen *et al.* 1991; Monte *et al.* 1993). Típicamente, tales marcadores detectan variaciones de secuencia del ADN en regiones circundantes a la sonda. El análisis RFLP requiere grandes cantidades de ADN e involucra diversas etapas tediosas que requieren tiempo en demasía, con sistemas de detección que usan radioisotopía o bioquímica compleja. Consecuentemente, su uso se torna difícil cuando se analizan poblaciones conformadas por un gran número de individuos (González-de-León *et al.* 1995).

Las metodologías fundamentadas en la reacción en cadena de la polimerasa⁸. Permiten identificar variaciones en la secuencia de nucleótidos dentro del fragmento de ADN amplificado, así como en las secuencias aledañas o flancos que se utilizan para la amplificación vía PCR. De tal manera, el análisis posibilita (sólo en las regiones antes mencionadas) la detección de eventos moleculares de inserción/supresión y de mutación puntual, así como de cambios en la longitud de las repeticiones (en el caso de los microsatélites). El que los análisis por PCR se efectúen con rapidez, eficacia y confiabilidad ha significado considerarles alternativos a aquel de los RFLP. En adición, es factible utilizar unos cuantos nanogramos de ADN como sustrato. La mayor limitante en algunos análisis por PCR es el de requerir previa información de secuencia para la síntesis de los iniciadores (Stuber 1992; González-de-León *et al.* 1995). Globalmente, es factible clasificar a las metodologías basadas en la PCR en tres tipos: las que requieren secuencias conocidas de amplificación específica (STS, SSR, ASA, SCAR⁹), aquellas apoyadas en la amplificación

⁶ *Restriction Fragment Length Polymorphisms*, Polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción.

⁷ sonda: secuencia definida de ácido nucléico de una sola cadena que puede hibridarse a una cadena desnaturalizada de ADN de secuencia complementaria (homóloga) (Griffiths *et al.* 1996).

⁸ En inglés, *polymerase chain reaction* (PCR).

⁹ STS (*Sequence Tagged Sites*, sitios de secuencia marcada), SSR (*Simple Sequence Repeats*, repeticiones de secuencia simple), ASA (*Allele-Specific Amplicon*, amplicón alelo-específico), SCAR (*Sequence-Characterised Amplified Regions*, regiones de amplificación de secuencia caracterizada).

Tabla 1. Resumen comparativo de las propiedades y requerimientos tecnológicos de distintas metodologías de marcaje molecular

	Isoenzimas	RFLP ¹	RAPD ²	DAF ³	SIS ⁴	AFLP ⁵	SSR ⁶	ISSR ⁷
<i>Principio</i>	Ensayo enzimático	Restricción por endonucleasa Transferencia Southern Hibridación	Amplificación de ADN con iniciadores al azar	Amplificación de ADN con iniciadores al azar	Posible restricción por endonucleasa de productos PCR	Restricción por endonucleasa Uso de adaptadores e iniciadores específicos	PCR de repeticiones de secuencia simple	PCR de repeticiones de secuencia simple ancladas
<i>Tipo de polimorfismo</i>	Diferente carga electroforética	Cambios de una sola base Inserciones Supresiones	Cambios de una sola base Inserciones Supresiones	Cambios de una sola base Inserciones Supresiones	Cambios de una sola base Inserciones Supresiones	Cambios de una sola base Inserciones Supresiones	Cambios de una sola base y de longitud de las repeticiones Inserciones Supresiones	Cambios de una sola base Inserciones Supresiones
<i>Abundancia genómica</i>	Baja	Alta	Muy alta	Muy alta	Alta	Muy alta	Alta	Media
<i>Nivel de polimorfismo</i>	Medio/Bajo	Medio	Medio	Medio	Medio	Alto	Alto	Medio
<i>Herencia</i>	Codominante	Codominante	Dominante	Dominante	Codominante	Dominante (?)	Codominante	Codominante
<i>Detección de variantes alélicas</i>	Si	Si	No	No	Si	No	Si	Si
<i>Número de loci detectados</i>	1-5	1-5	1-10	1-50 o más	1	30-100	1	1-Mav
<i>Información de secuencia</i>	No	No	No	No	Si	No	Si	Si
<i>Dificultad técnica</i>	Media	Media	Baja	Media	Baja	Media/Alta	Baja	Baja
<i>Confiabilidad</i>	Alta	Alta	Intermedia (productos falsos)	Intermedia (?)	Alta	Alta	Alta	Alta
<i>Calidad requerida de ADN</i>	-	Relativamente pura	Pura	Pura	Pura	Pura	Pura	Pura
<i>Cantidad requerida de ADN</i>	-	2-15 ug	10-50 ng	10-15 ng	50-100 ng	50-100 ng	10-100 ng	10-50 ng
<i>Uso de radioisótopos</i>	No	Si/No	No	Si/No	No	Si/No	Si/No	Si/No
<i>Tipos de sondas requeridas</i>	-	gADN, cADN	Oligonucleótidos de 9-10 nt al azar	Oligonucleótidos de 16 nt o más al azar	Iniciadores específicos 16-30 nt	Iniciadores y adaptadores específicos	Iniciadores específicos 16-30 nt	Iniciadores específicos 16-30 nt
<i>Fingerprinting⁸</i>	+	++	-/+	++	?	+++	++	+
<i>Diversidad Genética</i>	+	++	-	+	?	+	++	+
<i>Control de Calidad</i>	++	+	-	-	-	+	+	+
<i>Marcaje de Gen Cualitativo</i>	-	++	++	-	+	+++	+	?
<i>Cartografía de QTL</i>	-	++	-/+	-	+	++	+	?
<i>MAS⁹</i>	-	++	?	-	++	+/++	++	?
<i>Costos de iniciación</i>	Muy bajos	Regulares	Bajos	Regulares	Regulares	Altos	Regulares	Regulares
<i>Costos de desarrollo</i>	Muy bajos	Regulares	Bajos	Regulares	Regulares/Altos	Regulares/Altos	Altos	Altos

¹ Restriction Fragment Length Polymorphisms, Polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción; ² Random Amplified Polymorphic DNA, ADN polimórfico amplificado al azar; ³ DNA Amplification Fingerprinting, Caracterización de huellas genéticas por amplificación del ADN; ⁴ Sequence Tagged Sites, Sitos de secuencia marcada; ⁵ Amplified Fragment Length Polymorphisms, Polimorfismos de la longitud de fragmentos amplificados; ⁶ Simple Sequence Repeats, Repeticiones de secuencia simple; ⁷ Inter Simple Sequence Repeats, Inter repeticiones de secuencia simple; ⁸ Caracterización de huellas genéticas; ⁹ Marker-Assisted Selection, Selección facilitada (asistida) por marcadores
Modificación a: Rafalski y Tingey 1993; González-de-León et al 1995.

aleatoria de secuencias (RAPD, AP-PCR, DAF, ISSR, DGGE¹⁰), y las que exigen amplificación selectiva (SSCP, AFLP¹¹). Del conjunto de técnicas desarrolladas en los últimos años, se mencionan comparativamente a los RAPD y a las repeticiones de secuencia simple o microsatélites:

- A. Los RAPD se fundamentan en la amplificación vía PCR del ADN genómico usando un solo tipo de iniciador de secuencia al azar (~10 nt¹²) (Welsh y McClelland 1990a; Williams *et al.* 1990). En esta reacción, un solo tipo de iniciador se une a diferentes sitios en las cadenas sencillas del ADN patrón; de ubicarse estos sitios de iniciación dentro de una distancia *amplificable* uno con respecto del otro, se produce un fragmento de ADN vía PCR. La amplia disponibilidad de oligonucleótidos de secuencia arbitraria y los procedimientos técnicos sencillos, permiten el escrutinio relativamente rápido de muchos *loci*. Los polimorfismos RAPD son el resultado ya sea de un cambio de base de nucleótido que altera el sitio de unión del iniciador, de una inserción/supresión dentro de la zona de amplificación, o de apareamientos erróneos entre el iniciador y las cadenas de ADN. Ya que los polimorfismos se verifican por la presencia o ausencia de alelos en un solo *locus*, se concluye que la técnica sólo provee marcadores que registran una herencia de tipo dominante, lo cual restringe la información de la segregación (Williams *et al.* 1990; Reiter *et al.* 1992, Tingey y del Tufo 1993). Además, las condiciones de la PCR y el diseño arbitrario (no específico) del iniciador pueden ocasionar amplificaciones erróneas o de artefactos, pudiendo resultar en experimentos carentes de reproducibilidad. No obstante, su uso se ha extendido tanto en escrutinios de variabilidad genética (Welsh y McClelland 1990b; Arnold *et al.* 1991; Welsh *et al.* 1991), como en la detección de marcadores específicos para el genoma (Quiros *et al.* 1991; Klein-Lankhorst *et al.* 1991; Williams 1991; Paran y Michelmore 1993), y en la cartografía cromosómica (Carlson *et al.* 1991; Echt *et al.* 1992).
- B. Las secuencias simples de repetición o microsatélites [para explicación detallada, ver capítulo 4], son un tipo de marcadores moleculares enormemente polimórficos (más que los RFLP) que exhiben una alta diversidad alélica. Se diferencian de otras técnicas de esta clase (como los RAPD), en: verificar herencia codominante; y, requerir información previa de secuencia para el diseño de los iniciadores (de longitud ~20-30 nt), lo que los hace muy específicos.

¹⁰ RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*, ADN polimórfico amplificado al azar), AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*, PCR de hibridación arbitraria), DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*), ISSR (*Inter-simple sequence repeats*, inter-repeticiones de secuencia simple).

¹¹ SSCP (*Single-Strand Conformational Polymorphisms*, polimorfismos conformacionales de cadena sencilla), AFLP (*Amplified-Fragment Length Polymorphisms*, polimorfismos de la longitud de fragmentos amplificados).

¹² nt, nucleótidos.

1.3 Requerimientos de los marcadores para las aplicaciones en el fitomejoramiento

Los parámetros a considerar para la evaluación y elección del marcador molecular más apropiado para la investigación y manipulación de caracteres cuantitativos (Stuber 1992; Gepts 1994), son:

- ⊙ **Base molecular.** Los eventos moleculares responsables de los polimorfismos observados son considerados como la base molecular. La *simplicidad* o *complejidad* de la modificación de ésta se encuentra en función de los cambios en el nivel de la secuencia de nucleótidos y del número de eventos moleculares.
- ⊙ **Polimorfismo.** La mayor parte de las variaciones en la secuencia del ADN tienen lugar en los intrones y no inciden en la apariencia de un organismo o función, aunque pueden detectarse a nivel del ADN y utilizarse como marcadores. Útiles e informativos son aquellos marcadores que registran el mayor número de alelos por *locus*.
- ⊙ **Distribución genómica.** El sistema de marcadores deberá detectar el mayor número de *loci* o de grupos de ligamiento a todo lo largo del genoma.
- ⊙ **Cartografía.** La asociación y segregación de dos (o más) marcadores permite la construcción de un mapa de ligamiento.
- ⊙ **Estabilidad ambiental y experimental.** Las fluctuaciones ambientales no afectan (teóricamente) el análisis de marcaje molecular de manera significativa. La estabilidad experimental y reproducibilidad son fundamentales para contar con la plena certeza de que las diferencias observadas son, en realidad, genéticas.
- ⊙ **Factibilidad.** El análisis sobre un gran número de individuos o líneas requiere que los métodos de marcaje molecular sean rápidos, eficaces y lo menos costosos posible.

La utilidad relativa y las limitaciones de las diferentes técnicas de marcaje molecular en el fitomejoramiento, cartografía genética, cartografía comparativa, análisis de la diversidad vegetal, estudios de evolución vegetal, caracterización de genealogía o clonación de genes dependerá de el número de marcadores disponibles, la disponibilidad de equipo e instalaciones, las restricciones de los recursos económicos; y, de el sistema biológico a estudiar, la naturaleza de el (los) caracter(es), el tipo de población a generar, el número de individuos a examinar, el tipo de segregación a analizar, etc.

La metodología de una gran cantidad de marcadores moleculares, entre los que se encuentran los microsatélites, utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, en inglés). Con objeto de comprender la naturaleza de los análisis actuales con tales marcadores, es de importancia revisar el concepto teórico y ciertas consideraciones técnicas de la PCR, herramienta que ha significado una revolución en la manera de concebir a la biología y la genética molecular.

2- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

2.1 Edificio teórico

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción cíclica dirigida enzimáticamente que permite la amplificación *in vitro* de una región del ácido desoxirribonucleico (ADN), localizada entre dos regiones de secuencia conocida. Utiliza dos oligonucleótidos —que funcionan como “iniciadores”— que se hibridan a las cadenas opuestas de ADN de secuencia complementaria, flanqueando a la secuencia de interés (Saiki *et al.* 1985; Mullis *et al.* 1986; Mullis y Faloona 1987; Saiki 1989a,b; Newton y Graham 1995).

Una vez que los iniciadores (oligonucleótidos, amplímeros, detonadores o *primers*) —moléculas de ADN de cadena individual y longitud corta (~20-30 nt)— se hibridan complementariamente a las partes terminales o flancos de una secuencia específica de la cadena sencilla del ADN patrón, se efectúa la amplificación (extensión) por la polimerasa del ADN —enzima que cataliza la síntesis de cadenas largas de polinucleótidos—. La síntesis se

dirige incorporando monómeros de trifosfato de desoxinucleósido¹³ al grupo libre 3'-hidroxilo del iniciador en dirección 5' → 3' —la polimerización se efectúa siempre del α-fosfato 5' del trifosfato de desoxinucleósido al grupo hidroxilo terminal 3' de la cadena creciente de ADN (Watson *et al.* 1987)—. Esto resulta en la síntesis de nuevas cadenas de ADN complementarias a las cadenas patrón iniciales (Fig. 1).

En cada ciclo de amplificación, las cadenas de ADN sintetizadas se convierten en un patrón (o sustrato) para cualquier nuevo ciclo; idealmente, la secuencia de ADN "objetivo" se amplificará de manera selectiva ciclo tras ciclo.

Teóricamente, los productos de amplificación (amplicones) del primer ciclo serían el resultado de la síntesis de ADN del patrón original, de longitud indefinida. La polimerasa del ADN sintetizaría nuevas moléculas (a partir de tales moldes o patrones) hasta que fuese interrumpida por el inicio del siguiente ciclo. A partir del segundo ciclo, los productos de amplificación poseerían una longitud definida, pues únicamente se sintetizan los fragmentos de la secuencia "objetivo", cuya longitud correspondiera a las posiciones de alineamiento (anillamiento, ensamblaje) de los iniciadores con el patrón original. En lo consecutivo, la secuencia "objetivo" se amplificaría exponencialmente. Concretamente, la amplificación —entendida como el número final de copias de la secuencia "objetivo"— se expresa por la fórmula:

$$(2^n - 2n)x \approx x(2^n)$$

donde,

n = número de ciclos,

$2n$ = primer producto obtenido después del ciclo 1, y productos obtenidos después del ciclo 2 con longitud definida, y

x = número de copias del patrón original.

2.2 Parámetros de la PCR

La PCR es un evento bioquímico relativamente complicado y no del todo entendido, donde las cambiantes interacciones cinéticas entre los componentes determina la calidad de los productos a obtener (Saiki 1989b, Mullis 1989,1990). A pesar de ser extremadamente eficaz, la amplificación exponencial de los amplicones no es un proceso infinito. Un gran número de factores actúan en contra del proceso, siendo pronunciado su efecto en ciclos posteriores de la PCR.

2.2.1 Ciclos térmicos

Los parámetros de los ciclos de temperatura son considerablemente importantes para una PCR óptima. Los pasos más importantes en los perfiles del tiempo y temperatura a considerar, son (Innis *et al.* 1988; Saiki 1989a,b):

- **Etapas del ciclo de amplificación**

Desnaturalización. La temperatura entre 95-100°C provoca una desnaturalización completa del ADN genómico para permitir el ensamblaje posterior de los iniciadores. El daño térmico del ADN conduce a un índice creciente de *mala* incorporación de los nucleótidos, por lo que debe evitarse manejar temperaturas muy altas, y/o desnaturalizar por períodos prolongados —limitar la exposición ayuda también a mantener la actividad máxima de la polimerasa—. Sin embargo, existen moléculas de ADN de grandes proporciones o desmedidamente complejas —como plásmidos de ADN superenrollado—

¹³ *dideoxynucleoside triphosphates (dNTPs)*, en inglés: trifosfato de desoxiadenosina (dATP), trifosfato de desoxicitidina (dCTP), trifosfato de desoxiguanosina (dGTP), trifosfato de desoxitimidina (dTTP).

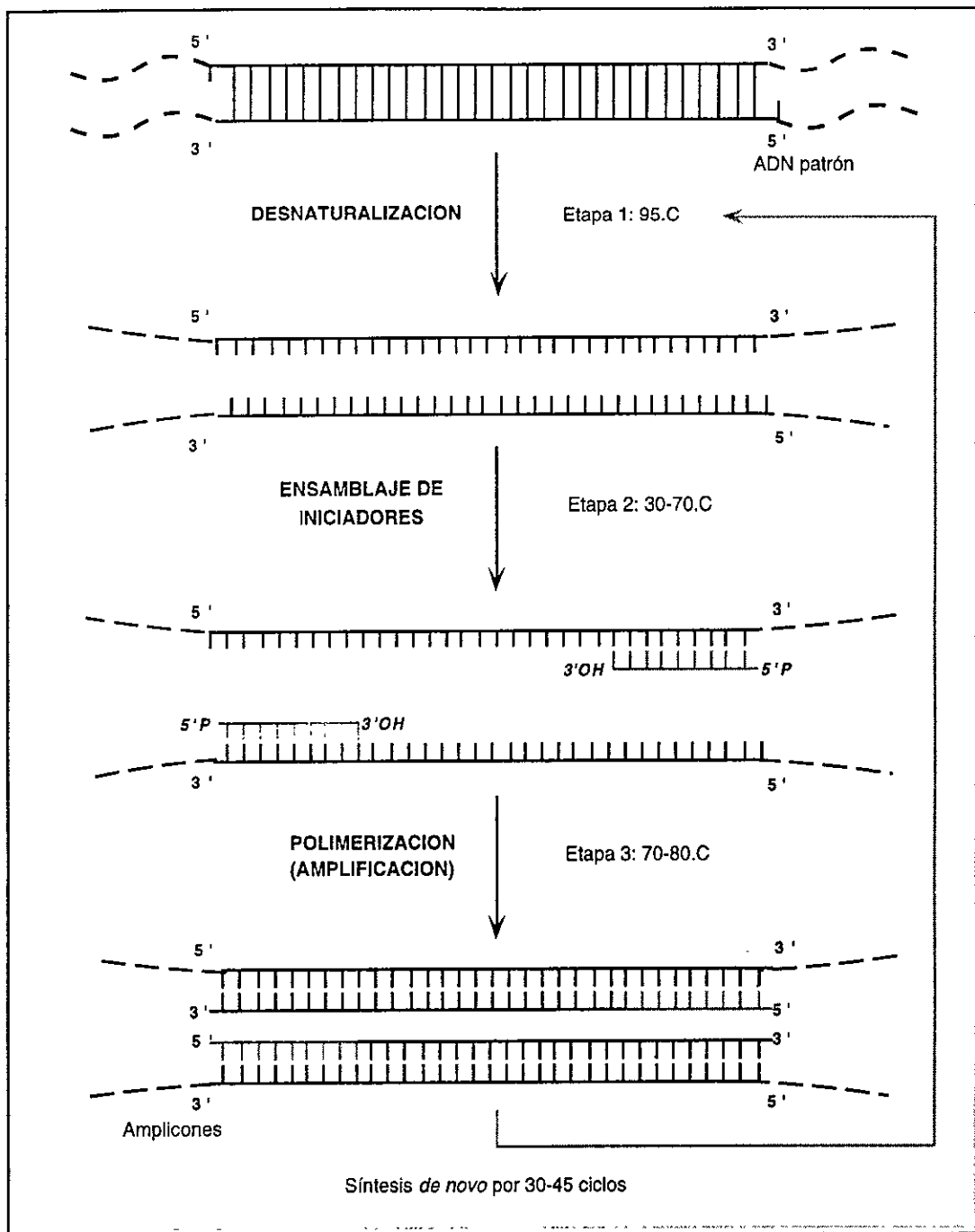


Fig.1. Representación gráfica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sean n ciclos = 2^n moléculas. Si $n = 40$, 1 molécula es amplificable $2^{40} = 10^{12}$ veces. Los amplicones resultantes del segundo ciclo, que sirven como sustrato para el ciclo de reacción subsecuente, darán un producto definido (Modificación a González-de-León *et al.* 1995).

que son más difíciles de desnaturalizar y que requieren mayor energía térmica, por lo que se sugiere la inmersión de los tubos de reacción en agua hirviendo por algunos minutos o un "hot start" (predesnaturalización). Por el contrario, el calentamiento insuficiente deviene en un completo fracaso de la PCR. Entonces, es fundamental establecer la temperatura según la longitud y el contenido de guanina y citosina (GC) de los iniciadores.

Ensamblaje. Período térmico que define el ensamblaje (alineamiento, anillamiento) o hibridación de los iniciadores a la secuencia complementaria; típicamente, entre 40 y 70°C. Se calcula en función de la longitud y contenido de guanina y citosina de los iniciadores.

Extensión. La extensión —propriadamente la amplificación o polimerización— se efectúa generalmente a 70-75°C, temperatura óptima de actividad para las polimerasas termoestables. La duración de los pasos de extensión puede incrementarse si se polimerizan amplicones de gran longitud, aun cuando la mayor parte de los tiempos de PCR se restringen a 2 minutos (1 minuto/1000 pb¹⁴ de secuencia "objetivo" o sustrato). A menudo, el tiempo de extensión del ciclo final es mayor (hasta 10 minutos) con objeto de asegurar la total extensión de las moléculas.

- **Número de ciclos.** Usualmente son 25 a 35. El aumento en el número de ciclos ocasiona un incremento en el número de productos no deseados, sin impacto alguno en el rendimiento del producto de elección. Así, es poco común encontrar protocolos experimentales con más de 40 ciclos.
- **Tiempos de declive.** Son períodos en los que se realizan los cambios de una temperatura a la siguiente dentro del termociclador¹⁵. Pueden determinarse con una sonda termocupla.

2.2.2 ADN patrón (o sustrato)

Secuencias patrón de ADN que pueden obtenerse a partir de ADN genómico, ADN clonado (a partir de clonas individuales o bancos genómicos: lambda, cósmidos o vectores BAC o YAC), y/o bancos de cADN (derivado de ARN total, ARN poli(A)⁺ ó ARNm).

La muestra de PCR puede ser de una o dos cadenas de ADN o ARN, no siendo generalmente el tamaño del ADN un factor fundamental. De utilizarse ADN genómico de alto peso molecular, se mejora la amplificación si se digiere previamente con enzimas de restricción. De no conocerse la concentración de la secuencia "objetivo" o sustrato, se recomienda optimizar la reacción con controles positivos de ADN; normalmente, se utilizan subnanogramos de un patrón clonado y submicrogramos de ADN genómico.

Potencialmente, la PCR puede realizar la amplificación de una sola molécula de ADN en grandes números —es factible amplificar una secuencia a partir de cantidades del orden de picogramos—, por lo que debe extremarse el cuidado en el manejo de reactivos y muestras, así como reducir al mínimo cualquier posibilidad de contaminación.

¹⁴ pb, pares de bases.

¹⁵ Termopar programable que regula la temperatura de un bloque de calentamiento (donde se disponen los tubos de PCR) por un determinado tiempo, de acuerdo con los requerimientos de la PCR a efectuar (Oste 1989).

2.2.3 Concentración de enzimas

La introducción de las polimerasas termoestables del ADN (Tablas 2 y 3) posibilitó la automatización de la PCR, pues sólo se incorporan al inicio del proceso de amplificación. La primera polimerasa del ADN termoestable utilizada fue la polimerasa *Taq* (Saiki *et al.* 1988).

Los resultados obtenidos, en términos de amplificaciones de alto rendimiento (Kim y Smithies 1988), de uno o varios fragmentos (Mullis y Faloona 1987; Chamberlain *et al.* 1988), o de fragmentos de gran longitud (Jeffreys *et al.* 1988) reportan el uso de cantidades considerables de la enzima (1-4 U/100 µl). Utilizar mayores cantidades puede resultar en la producción de productos no específicos y/o en la reducción del rendimiento del amplicón "objetivo". La concentración típica de la enzima usada es de 2U/100 µl de volumen de reacción (Saiki 1989a,b). Normalmente, la cantidad de la enzima se torna limitante luego de 25 a 30 ciclos de PCR, debido a un exceso molar de la secuencia "objetivo".

La solución tampón más usada con la polimerasa *Taq*/Amplitaq® del ADN se encuentra concentrada 10 veces, a diluir 1:10 (v/v) antes de usar: 100 mM Tris-HCl, pH 8.4 a temperatura ambiente; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; y, 0.1% (w/v) de gelatina o glicerol (en lugar de albúmina de suero bovino).

Para el desarrollo de la reacción, la enzima polimerasa del ADN requiere (mínimo) 1 mM de magnesio libre, lo que significa que las concentraciones de magnesio deberán ser 1 mM mayores que la concentración total de los dNTPs —ya que secuestran magnesio—. Esto es, la cantidad de Mg²⁺ libre disponible para la polimerasa *Taq* del ADN resulta de la sustracción de la concentración total de dNTPs de la concentración total de MgCl₂.

La concentración de MgCl₂ tiene un efecto brutal sobre la especificidad y rendimiento de la PCR. La concentración óptima de MgCl₂ en la mezcla final de reacción puede variar dentro del intervalo de 1.0-1.5 mM, pero en ciertas ocasiones se ensayan diferentes concentraciones de Mg²⁺ (considerando una cantidad individual de dNTP del orden de 200 µM). Los iones Mg²⁺ estimulan la actividad de la polimerasa e incrementan la temperatura de fusión (*T_m*) del ADN de doble hélice, así como la interacción iniciador/secuencia patrón. La concentración insuficiente de Mg²⁺ deviene en bajos rendimientos; en tanto que el exceso, en la acumulación de productos no específicos e inhibición de la actividad de la enzima (Gelfand 1989).

Tabla 2. Polimerasas termoestables del ADN y fuentes de origen

Polimerasa del ADN	Natural/recombinante	Fuente de origen
<i>Taq</i>	Natural	<i>Thermus aquaticus</i>
Amplitaq® (Fragmento Stoffel)	Recombinante	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>Tub</i> [™]	Natural	<i>Thermus flavis</i>
PyroStasa [™]	Natural	<i>Thermus flavis</i>
Vent [™]	Recombinante	<i>Thermococcus litoralis</i>
DeepVent [™]	Recombinante	<i>Pyrococcus GB-D</i>
<i>Tth</i>	Recombinante	<i>Thermus thermophilus</i>
<i>Pfu</i>	Natural	<i>Pyrococcus furiosus</i>
UITma [™]	Recombinante	<i>Thermotoga maritima</i>

Modificación a Newton y Graham 1995.

Tabla 3. Propiedades de las polimerasas del ADN comúnmente usadas en PCR

Propiedades	<i>Taq</i> / Amplitaq [®]	Fragmento de Stoffel	<i>Vent</i> ¹	Deep <i>Vent</i> [®]	<i>Pfu</i> ¹	<i>Tth</i>	UITma [®]
Termoestabilidad o vida media a 95°C (min)	40	80	400	1380	>120	20	>50 ^b
Actividad exonucleasa 5'→3'	Si	No	No	No	No	Si	No
Actividad exonucleasa 3'→5'	No	No	Si	Si	Si	No	Si
Proceso (nt/seg)	50-60	5-10	7	n.i.	n.i.	30-40	n.i.
Intervalo de Extensión (nt/sec)	75	>50	>80	n.i.	60	>33	n.i.
Actividad de Transcriptasa Reversa	Mínima	Mínima	n.i.	n.i.	n.i.	Si	n.i.
Porciones finales del ADN resultante	3'A	3'A	>95% ^a obtuso	>95% ^a obtuso	n.i.	3'A	obtuso
Desplazamiento de cadena	n.i.	n.i.	Si	Si	n.i.	n.i.	n.i.
Peso molecular (kDa)	94	61	n.i.	n.i.	92	94	70

¹ *Vent* y *Pfu* están disponibles en su forma exonucleasa negativa (exo).

^a Desplazamiento de cadena dependiente de la temperatura.

^b Medido a 97.5°C.

n.i., no existe información.

Modificación a Newton y Graham 1995.

2.2.4 Iniciadores

2.2.4.1 Diseño

Para el diseño y selección de iniciadores de PCR se deben considerar tres parámetros esenciales: a) la hibridación estable de un iniciador con el sitio específico en la región "objetivo" del ADN patrón o sustrato para el cual fue diseñado; b) la estabilidad interna del iniciador; y, c) la ausencia de complementariedad interna o con otro iniciador.

La estabilidad del iniciador puede medirse por la longitud (en pares de bases) del duplo ADN-iniciador, el cociente GC/AT, la energía libre del duplo (kcal/mol), o por la temperatura de fusión (en °C). Para realizar con exactitud los cálculos, se deben considerar varios parámetros termodinámicos, cuestión que se facilita con el uso de programas computacionales (p.e., OLIGO™, Primer detective™). Éstos permiten calcular la estabilidad del dúplex ADN-iniciador, la composición y porcentaje de desoxinucleótidos; analizar las posibles interacciones del par más cercano, las regiones de complementariedad del ADN, los sitios de formación de dímeros de iniciador, o la longitud de amplicones; contemplar cuestiones como la estructura secundaria, la formación de palíndromas, etc.

En general, los iniciadores utilizados en la PCR constan de 20 a 30 nucleótidos de longitud, lo que permite utilizar altas temperaturas de ensamblaje e incrementar la especificidad de la reacción. Cuanto menor sea la longitud de los iniciadores, menor será la especificidad de hibridación con la secuencia patrón. De ser posible, los iniciadores deben elaborarse con un número aproximadamente igual de cada una de las cuatro bases, evitando regiones de secuencia anormal —*i.e.*, tramos de polipurinas, polipirimidinas, o patrones de repetición; y secuencias con estructura secundaria.

2.2.4.2 Estabilidad interna

Los iniciadores que mejor desempeño exhiben en la PCR y en la secuenciación del ADN son aquellos que son estables en la extremidad 5' y relativamente inestables en la 3'. Un iniciador con baja estabilidad en el extremo 3' funcionará bien en la PCR porque el alineamiento (de esa zona) con sitios no específicos no es lo suficientemente estable como para que se inicie la polimerización. Por ende, el extremo 5' y la parte central del iniciador deberán formar un duplo con el sitio "objetivo" del ADN para lograr un ensamblaje eficiente. En contraposición, la polimerización de los oligonucleótidos con extremos 3' de alto contenido de GC, resulta (en muchas ocasiones) en amplicones no específicos: el ensamblaje se realiza sólo por esas zonas y no por la totalidad del iniciador, pudiéndose efectuar la PCR con regiones que no sean iguales a la secuencia "objetivo" (Rychlik *et al.* 1990).

Los iniciadores no deben tener *inter* o *intra* complementariedad con las extremidades 3', pues se reducen considerablemente las posibilidades de formación de **dímeros de iniciador** (*primer dimers*). Éstos son el resultado de un evento de amplificación cuando se elonga (léase extiende) un iniciador sobre el otro (o a sí mismo), sea por aproximación de las porciones 3' de los iniciadores, complementariedad de secuencia y/o ventaja cinética.

2.2.4.3 Temperatura de fusión (*melting temperature*, T_m)

La T_m puede calcularse para un iniciador empleando algunas ecuaciones, siendo indicado para cada reacción de amplificación considerar a los iniciadores como un par, donde cada uno posee una T_m similar; o bien, puede determinarse la T_m de acuerdo con valores termodinámicos de energía libre entre combinaciones sucesivas de los nucleótidos¹⁶ (Breslauer *et al.* 1986; Freier *et al.* 1986).

La fórmula más ampliamente usada es:

$$T_m = [(\text{número de A+T})(2^\circ\text{C}) + (\text{número de G+C})(4^\circ\text{C})]$$

originalmente calculada en una concentración salina 1M para pruebas de hibridación de oligonucleótidos. Sin embargo, es inexacta con iniciadores mayores de 20 nucleótidos (nt) y requiere de correcciones para la concentración salina. Por tanto, se ha propuesto la ecuación (Breslauer *et al.* 1986; Freier *et al.* 1986):

$$T_m^{\text{iniciador}} = \frac{\Delta H}{(\Delta S + R)(\ln(c/4))} - 273.15 + 16.6 \log[Na+] \quad (I)$$

donde,

ΔH = entalpía

ΔS = entropía

R = constante molar de un gas (1.987 cal/°Cx mol)

c = concentración del iniciador

¹⁶ En inglés, *nearest-neighbor thermodynamic values*.

La T_m de productos de PCR (T_m^{producto}), requerida en el cálculo de la temperatura óptima de ensamblaje (T_a^{OPT}), no puede inferirse a partir de la ecuación I ya que no es posible aplicar el modelo de combinaciones sucesivas. De aquí que se usen otras (Baldino *et al.* 1989; Newton y Graham 1995):

$$T_m = 81.5 + 16.6(\log_{10}[J^+]) + 0.41(\%G+C) - (600/l) - 0.63(\%FA) \quad (\text{II})$$

donde,
 $[J^+]$ = concentración de cationes monovalentes
 l = longitud de oligonucleótidos
 FA = formamida

$$T_p = 22 + 1.46(l_n) \quad (\text{III})$$

donde,
 T_p = temperatura óptima de ensamblaje $\pm 2-5^\circ\text{C}$
 l_n = longitud efectiva del iniciador = 2 (número de G+C) + (número de A+T)

$$T_a^{\text{OPT}} = 0.3T_m^{\text{iniciador}} + 0.7T_m^{\text{producto}} - 14.9 \quad (\text{IV})$$

Las fórmulas enunciadas anteriormente son utilizadas para el cálculo de T_m de los iniciadores de longitud de 14-70 nt (ecuación II) y 20-35 nt (ecuación III y IV). Las temperaturas de ensamblaje óptimas son aproximadas a las T_m reales, de ahí que se les considere como parámetros de referencia para iniciar la experimentación. Las temperaturas de ensamblaje óptimas pueden encontrarse 3-12°C por arriba de la T_m calculada. Si se planea una PCR rutinaria de un fragmento en particular, entonces la temperatura de ensamblaje óptima puede determinarse empíricamente, para lo cual es obligado usar la temperatura de ensamblaje más alta, pues redundará en mejores productos de PCR (Newton y Graham 1995).

2.2.4.4 Cálculo de la concentración

Las concentraciones óptimas de los iniciadores varían en gran medida según las secuencias de los iniciadores, de la complejidad de la secuencia "objetivo" en la muestra de ADN, y del número de ADNs "objetivo" presentes en la muestra. Para la mayor parte de las secuencias "objetivo" genómicas, la concentración del iniciador debe ubicarse en el intervalo de 0.1-1.0 μM para obtener mejores resultados. La relación entre las altas concentraciones de los iniciadores con respecto de las bajas concentraciones de las cadenas producto supone una ventaja cinética —al equilibrio, las últimas podrían rehibridarse unas con otras y desplazar a los iniciadores. Tal ventaja puede perderse si, en el preciso instante posterior a la hibridación de los iniciadores, no existe suficiente enzima.

Para calcular la concentración de los iniciadores, debe estimarse el coeficiente de extinción molar del iniciador a 260 nm (Newton y Graham 1995), usando:

$$(8400)(T) + (15200)(A) + (12010)(G) + (7050)(C)$$

donde,
 T, A, G y C = número de veces de aparición de cada residuo en el iniciador

El coeficiente de extinción molar es equivalente a la densidad óptica a 260 nm (A_{260}) de una solución 1 M de un iniciador. La densidad óptica de una solución del iniciador, entonces, se mide a 260 nm (si el iniciador no está purificado, se diluye 50 veces). Dividiendo la A_{260} de la solución *stock* del iniciador entre el coeficiente de extinción molar, se obtendrá la concentración molar del iniciador. Los iniciadores pueden ser diluidos a concentraciones variables (2.5-20 μM) para una "solución de trabajo", según las necesidades.

2.2.4.5 Marcaje

Los productos de la PCR pueden marcarse vía los iniciadores utilizados o, durante o después de la amplificación (Newton *et al.* 1993):

- ⊙ **Marcaje enzimático** con ^{32}P por incubación con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y por la cinasa del polinucleótido T4. El producto puede detectarse fácilmente y usarse después en secuenciación directa, en "*footprinting*" o en el análisis del polimorfismo de conformación de una cadena (*single-strand conformation polymorphism*, SSCP).
- ⊙ **Bionitilación** (con fosforamiditas de biotina) en sus porciones 5'. La detección y cuantificación de los amplicones se efectúa por captura con avidina o estreptoavidina, seguida de una desnaturalización para su uso en secuenciación de cadenas sencillas.
- ⊙ **Adición de grupos fluorescentes**. Por el marcaje en diferentes sitios sobre un par específico de iniciadores, es posible detectar las secuencias "objetivo" en una sola reacción de PCR y utilizarles como sondas para RFLP. La fluoresceína es añadida directamente al iniciador durante la síntesis usando fosforamidita de fluoresceína. Otros tintes fluorescentes (como los ésteres activos) se unen químicamente al iniciador después de la síntesis vía un grupo 5'-amino.
- ⊙ **Quimiluminiscencia** (p.e., Hoisington *et al.* 1994). Técnica altamente sensible, se compone de los siguientes pasos: marcaje de los trifosfatos de nucleósidos con digoxigenina (esteroide proveniente de *Digitalis*, spp.), detección con un conjugado anticuerpo-enzima (antidigoxigenina-fosfatasa alcalina), detección mediante un substrato quimioluminiscente (AMPD, CSPD o Lumi-Phos), y exposición a una película de rayos X.

2.2.5 Trifosfatos de desoxinucleósidos (dNTPs)

De cada uno de los dNTP, se requiere una concentración de 50-200 μM para sintetizar 6.5-25 ng/ μl de ADN, respectivamente. Una concentración mayor tendería a promover la incorporación errónea por la polimerasa del ADN. Pueden manejarse soluciones de almacén (*stock*) ya sea individualmente o en mezcla (de los cuatro dNTPs). Normalmente, se encuentran a un pH de 7.5 por NaOH. La concentración óptima de los dNTPs determina:

- ⊙ la concentración de MgCl_2 y de la enzima —puesto que los dNTPs forman un complejo soluble con los iones Mg^{2+} , esencial para la incorporación de éstos al amplicón—,
- ⊙ la longitud del producto amplificado, y
- ⊙ el número de ciclos de PCR.

2.2.6 Promotores e inhibidores de la PCR

Diferentes sustancias inhiben o *promueven* la PCR (Tabla 4), dependiendo de la naturaleza de los especímenes biológicos nativos, y de los métodos y reactivos usados para la extracción del ADN. Los especímenes biológicos usados en la PCR a considerar engloban tejidos animales, muestras bacterianas, material forense y arqueológico, y tejido vegetal.

Deben usarse con tiento y cuidado a los detergentes iónicos (p.e., dodecilsulfato de sodio, SDS) en los métodos de extracción de ADN, pues es muy probable que inhiban los efectos de la enzima polimerasa. Las trazas de solventes tales como el fenol, cuando utilizado en la purificación del ADN, deben removerse por extracción por cloroformo:alcohol iso-amílico (49:1) o por precipitación etanólica. En adición, es recomendable evitar el uso de la proteinasa K, pues es una proteasa que digiere proteínas desnaturalizadas, y podría afectar a la polimerasa del ADN. En el caso de que se efectúe una RT-PCR¹⁷, es fundamental remover la totalidad de ADN; viceversa, la presencia de ARN puede interferir en las PCR donde se use ADN como sustrato.

Tabla 4. Promotores e inhibidores de la PCR

Promotores	Inhibidores
Glicerol o gelatina (10-15%)*	Formamida (>5%)
Dimetilsulfóxido (<10%)*, cloruro de tetrametilamonio (10-100 µM) *, polietilenglicol 6000 (5-15%)*	Fenol, cloroformo, etanol, EDTA, urea
Tritón X-100 ó Tween 20 (0.1-2.5%)*	Dodecil sulfato de sodio, SDS
ADN/ARN de calidad (alta pureza)	Restos de ADN (en el caso de RT-PCR*)
Ausencia de polisacáridos	Residuos de polisacáridos
pH <8.0	Proteinasas (en el caso de RT-PCR)
	pH >8.0

*A concentraciones mayores, inhiben a la polimerasa *Taq* del ADN.

* *Reverse Transcription PCR*.

Modificación a Newton y Graham 1995.

2.2.7 Aparatos

Hasta el momento, dos métodos rigen la automatización de la PCR (Oste 1989; Sobral y Honeycutt 1994):

© **Termocicladores.** Diversos diseños tecnológicos se han elaborado para los instrumentos de ciclaje térmico, manufacturados por diversas compañías comerciales, con paquetes de programación fáciles de usar y con controles térmicos confiables:

- i. Calentamiento y enfriamiento por fluidos.
- ii. Calentamiento por resistencia eléctrica y enfriamiento por semiconductores.
- iii. Calentamiento por luz de superficies de metal y enfriamiento por aire.
- iv. Calentamiento por resistencia eléctrica y enfriamiento por fluido o circulación de refrigerante.

¹⁷ En inglés, *Reverse Transcription PCR* (PCR de transcripción reversa). Metodología molecular altamente sensible que permite el análisis simultáneo de varios transcritos de ARN total, y que puede ser utilizada en la cuantificación relativa o absoluta de secuencias de ARNm. En esencia, consta de dos etapas experimentales: a) amplificación vía PCR que utiliza al ARN total o al ARNm como sustrato, a partir de los cuales se obtiene ADNc mediante la enzima transcriptasa reversa e iniciadores de seis nucleótidos al azar u oligos(dT); y, b) amplificación por PCR empleando al ADNc como sustrato y a la enzima polimerasa (Montarras *et al.* 1994).

El termociclador es un tipo de termopar, es decir, un aparato térmico en el que el calor se absorbe en una unión (de dos metales disímiles) caliente y se expulsa por otra fría, siendo la diferencia térmica convertida en energía eléctrica y viceversa —*i.e.*, procesos de calentamiento y enfriamiento—; con la particularidad de contar con programación electrónica que permite regular la temperatura y el tiempo de los ciclos requeridos para una PCR. Se fundamentan en los efectos físicos Seebeck (*i.e.*, conversión de energía térmica en eléctrica mediante un termopar) y Peltier (*i.e.*, transformación de energía eléctrica en térmica) (Tippens 1988).

Una delgada capa de aceite mineral (o, aceite, silicón o gemas de cera), sobrepuesta a la mezcla de PCR, es necesaria para prevenir la evaporación de ésta, antes de colocar los tubos de reacción en aquellos termocicladores que no calienten la tapa del tubo de reacción.

- © **Robótica.** Instrumentación que requiere de programas computacionales y de unidades mecánicas, la robótica se utiliza para definir las cantidades precisas de cada uno de los reactivos, controlar el brazo mecánico que escancia los reactivos, y transferir las muestras a diferentes bloques térmicos. La automatización de la PCR permite el análisis rápido de grandes números de muestras (del orden de miles) en un corto tiempo, en condiciones estándar —libres de errores humanos, en lo relativo al manejo y pipeteo de los reactivos— (Dietrich *et al.* 1992; Nelson *et al.* 1992; Sobral y Honeycutt 1993).

En efecto, la PCR ha significado una revolución conceptual y experimental de impacto en múltiples disciplinas. Particularmente, la tecnología actual del marcaje microsatélite se ha beneficiado enormemente al incorporar tal método a la amplificación selectiva de las secuencias flanco que les acompañan.

Las innovaciones en tecnología y reactivos utilizados en la PCR continúan avanzando de manera tal que, seguramente, en el futuro cercano se contará con noveles métodos de análisis y diagnóstico que permitirán acelerar la generación de conocimientos biológicos, químicos, termodinámicos y genéticos (White 1996).

3 - SECUENCIAS DE REPETICIÓN EN EL ADN

Los microsatélites conforman una clase del ADN de secuencias de repetición. El descubrimiento de estas regiones y el desarrollo de la metodología de estos marcadores moleculares tiene varios antecedentes conceptuales y experimentales dignos de mención.

3.1 ADN repetitivo

A pesar de que la mayoría de los genes estructurales eucarióticos son individuales, se conocen varios genes múltiples o duplicados en tándem —como los que codifican a los ARNr o histonas (Curtis 1986). Además de éstos, las células eucarióticas contienen otras regiones de ADN, comúnmente denominadas como secuencias repetidas o de repetición (Britten y Kohne 1968; Rieger *et al.* 1976). Representan numerosos tipos de secuencias de nucleótidos que se caracterizan por (Britten y Kohne 1968):

- 1) el número de pares de nucleótidos por secuencia,
- 2) el orden específico de los pares de base por secuencia, y
- 3) el número de copias de una secuencia por genoma.

En los estudios que condujeron a su descubrimiento se inducía la desnaturalización térmica del ADN de doble cadena y la reasociación o ensamblaje de las mismas, para observar el índice de reasociación o ensamblaje de las cadenas sencillas en función del tiempo (Britten y Kohne 1968; Rieger *et al.* 1976). Supuestamente, todos los fragmentos de ADN formarían duplos a la misma velocidad; en realidad, el ADN se comenzó a reasociar más rápidamente de lo que se esperaba. Tal cinética de reacción permitió elucidar lo que posteriores análisis de secuencias confirmarían: son secuencias repetidas en el genoma aquellas que se ensamblan (hibridan) con mayor celeridad luego de una desnaturalización térmica (Darnell *et al.* 1990; Griffiths *et al.* 1996) (Fig.2).

Los parámetros que determinarían el grado de reasociación de las cadenas serían la concentración molar inicial del ADN y el tiempo requerido para la reacción. Esto se conoce como el valor C_0t ¹⁸, el cual ha contribuido a discernir y tipificar diferentes clases de ADN (Fig.3).

Existen dos categorías de ADN repetitivo en función de la cinética de desnaturalización-renaturalización (valor C_0t):

1. Fracción altamente repetitiva o "rápida", constituida por repeticiones cerca de 10^6 veces y consistente de secuencias simples del ADN.
2. Repetición intermedia o fracción media constituida de secuencias repetidas de 10^2 a 10^4 veces en cada 200-300 pb, distribuidas en la mayoría de instancias entre regiones de ADN única o no repetitiva.

3.2 Secuencias de ADN sin función conocida

Para algunos ADN repetitivos, no se conoce función alguna. Esta categoría abarca secuencias de ADN que normalmente tienen muchas más copias en el genoma que aquellas de codificación o que las funcionales (Griffiths *et al.* 1996). Comprenden secuencias tales como el ADN satélite, los VNTR¹⁹ o minisatélites, o los microsatélites.

¹⁸ Expresión para el cociente de la renaturalización (ensamblaje) del ADN (o del ARN), utilizado para definir la organización del genoma. Los valores se definen como $C_0 \times t$ (C_0 es la concentración inicial de ADN expresado en moles de fósforo del ADN o en moles de nucleótido por litro, y t es el tiempo de renaturalización bajo condiciones estándares en segundos). Se expresa en una escala logarítmica en el rango de 10^{-4} a 10^4 (≈ 260 unidades/ml \times hr/2 = C_0t) (Britten y Kohne 1968).

¹⁹ En inglés, *Variable Number of Tandem Repeats* (número variable de repeticiones en tándem).

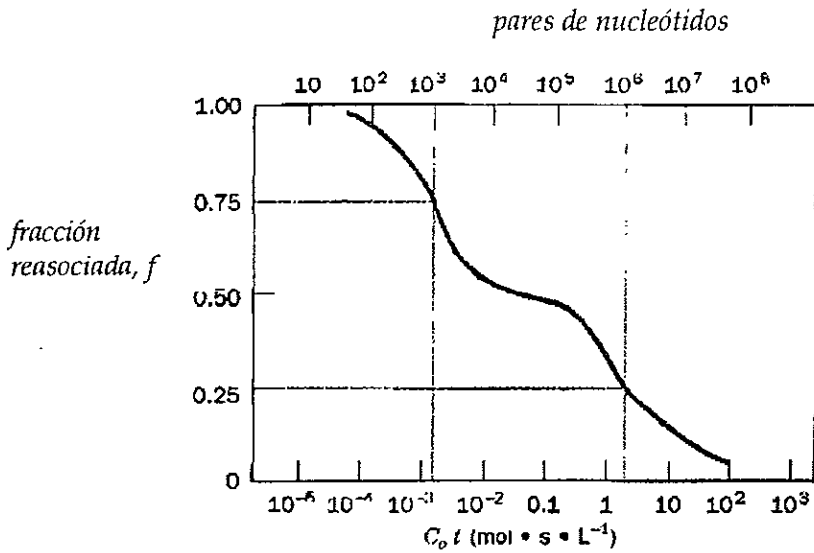


Fig.2. Curva hipotética del $C_0 t$ de una molécula de ADN que, previamente a la fragmentación (separación por densidad y masa molecular en función de los cocientes de sedimentación, cuando se somete el ADN a ultracentrifugación), era de 2×10^6 pb de longitud y consistía de una secuencia única de 1×10^6 pb y 1000 copias de una secuencia de 1000 pb. Nótese la naturaleza bifásica de la curva (Voet y Voet 1990).

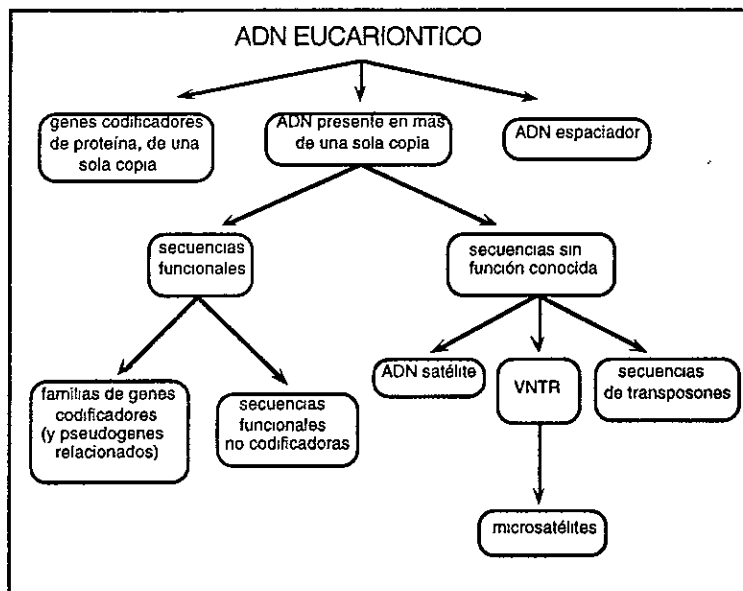


Fig.3. Clasificaciones del ADN eucariótico (modificación a Griffiths *et al.* 1996).

3.3 ADN satélite

El ADN satélite se encuentra en eucariontes (Kit 1961; Rieger *et al.* 1976), clasificado como citoplasmático y nuclear. Se define como cualesquiera fracciones de ADN lo suficientemente diferentes del componente mayor de ADN en cuanto a composición de bases, como para distinguirlos en forma de bandas luego de la centrifugación en un gradiente isopícnico del cloruro de cesio (CsCl) (Britten y Kohne 1968; Rieger *et al.* 1976; Cooney y Matthews 1984) (Fig.4).

En los eucariontes, el ADN satélite nuclear se describe como ligero (rico en A + T) o pesado (rico en G + C) cuando se le compara con la banda principal de ADN en gradientes salinos de CsCl. Está conformado por cientos de miles de secuencias repetitivas aglomeradas en el genoma y representa una porción de las familias de secuencias repetitivas de ADN. La unidad de repetición de los diferentes ADN satélites es extremadamente variable en tamaño (de menos de 10 a 300-400 nt) que puede abarcar hasta 10^5 pb en longitud. En general, los ADN satélites comparten propiedades tales como: transiciones de fusión, rápida renaturalización luego de una desnaturalización en CsCl, y alta especificidad de especies.

Se les ha encontrado asociados con la heterocromatina adyacente a los centrómeros (heterocromatina pericéntrica). Es posible encontrar más de un tipo de ADN satélite en el centrómero de un organismo determinado.

Este tipo de secuencias parecen haberse originado de manera independiente en el curso de la evolución, a partir de la replicación *saltatoria* de ciertas secuencias no repetitivas de nucleótidos. Se replican como una unidad funcional o como un conjunto sincronizado de unidades.

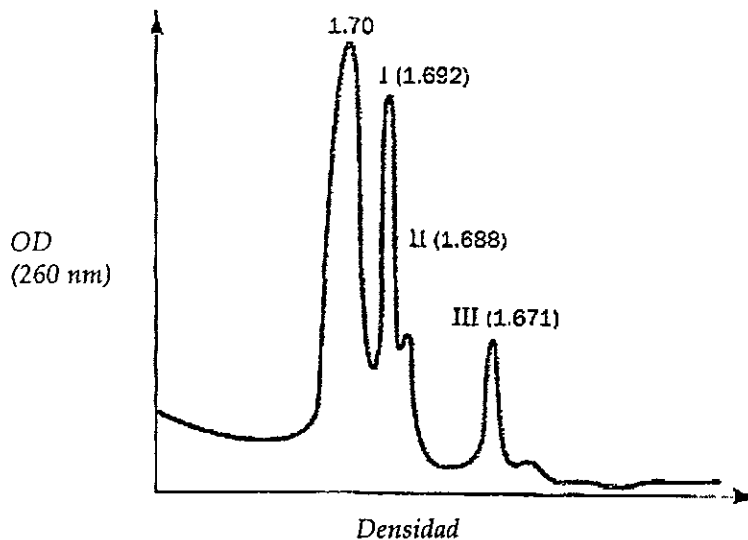


Fig.4. Gráfica que ilustra el patrón de la densidad de ADN de *Drosophila virilis*, centrifugado al equilibrio en CsCl neutro. Tres bandas de ADN satélite ($\rho = 1.692$, 1.688 , y 1.671) están presentes, adicionales a la banda principal ($\rho = 1.70$) (tomado de Voet y Voet 1990).

3.4 *Loci* del número variable de repeticiones en tándem o minisatélites

Existen regiones genómicas hipervariables que han sido descritas en numerosos organismos eucarióticos (Tautz 1989; Litt y Luty 1989; Weber y May 1989; Hamada *et al.* 1982; Stalling *et al.* 1991). Consisten en secuencias relativamente cortas de ADN con unidades en tándem de 15-75 nucleótidos que se extienden por 1 a 5 kb²⁰ (Jeffreys *et al.* 1985a,b), denominadas como minisatélites.

Los minisatélites se ubican adyacentes a genes de secuencia única y presentan un alto grado de polimorfismo (Jeffreys 1987; Nakamura *et al.* 1987). Siempre se encuentran acompañados de secuencias altamente conservadas que les flanquean.

Esta categoría de repeticiones en serie están presentes a todo lo largo del genoma; sin embargo, en humanos los minisatélites parecen aglomerarse en la vecindad de los telómeros (Weissenbach *et al.* 1992).

Hasta el momento, se ha codificado un término general para englobar a varias clases de *loci* que comparten las características antes referidas: número variable de repeticiones en tándem (Nakamura *et al.* 1987).

Probablemente, las causas que originen el elevado polimorfismo de estas secuencias sean las diferencias alélicas en el número de repeticiones, producto de intercambios desiguales en la mitosis y la meiosis; o, por mal apareamiento de las cadenas del ADN durante la replicación (Jeffreys *et al.* 1985a). Tales variaciones en la longitud de los minisatélites pueden detectarse si se digiere al ADN genómico con una endonucleasa de restricción que no reconozca la región de repetición, produciendo *loci* moleculares de herencia estable que pueden detectarse con una sonda marcada (con unidades de repetición en tándem) (Jeffreys *et al.* 1985a,b).

Una vez caracterizados los *loci* minisatélites en genomas animales, creció el interés de utilizarlos para estudios de variabilidad genética en plantas. Inicialmente, al usarse la unidad de repetición de un *locus* minisatélite humana como sonda de hibridación con genomas vegetales (Vassart *et al.* 1987; Dallas 1988). Posteriormente, fueron rastreadas secuencias minisatélites específicas en bancos de ADN vegetal para el diseño de sondas.

Este tipo de marcadores han sido empleados fundamentalmente en "caracterización de genealogía" —léase *fingerprinting*—, y en estudios de variabilidad genética vegetal (Rogstad *et al.* 1988; Zimmerman *et al.* 1989; Nybom 1990; Nybom *et al.* 1990; Rogstad *et al.* 1991; Vahala *et al.* 1991).

²⁰ kb, kilopares de bases (=1000 pares de bases).

4- MICROSATÉLITES

Estudiadas en diversos organismos, las repeticiones en serie se aislan como picos de satélite en gradientes de densidad en equilibrio, es decir satélites del ADN (Cooney y Matthews 1984). La caracterización primera de los *loci* hipervariables (Jeffreys *et al.* 1985a,b) les definió como repeticiones en serie de secuencias, ubicados adyacentemente a genes de secuencia única (Jeffreys 1987; Nakamura *et al.* 1987). De aquí que se englobe a los microsátélites en el grupo de *loci* denominado número variable de repeticiones en tándem.

4.1 Edificio teórico

Las repeticiones de secuencia simple (*Simple Sequence Repeats, SSRs*), también conocidos como microsátélites (*microsatellites*) (Litt y Luty 1989; Weber y May 1989) o repeticiones de secuencia corta (*Short Sequence Repeats, SSRs*) (Jacob *et al.* 1991), son secuencias de ADN de longitud variable (~1-10 *mers*²¹) repetidas en serie de di-, tri-, tetra- o penta- desoxinucleótidos [tales como (AC)_n, (AG)_n, (AT)_n (Rafalski y Tingey 1993), (GT)_n, (GATA/GACA)_n (Weising *et al.* 1989), (ATT)_n (Wu y Tanksley 1993)]. Sean cualesquier clases de repetición, siempre se acompañan de secuencias específicas en los flancos, mismas que fungen como modelo o patrón para la elaboración de iniciadores en la amplificación de PCR (Fig.5).

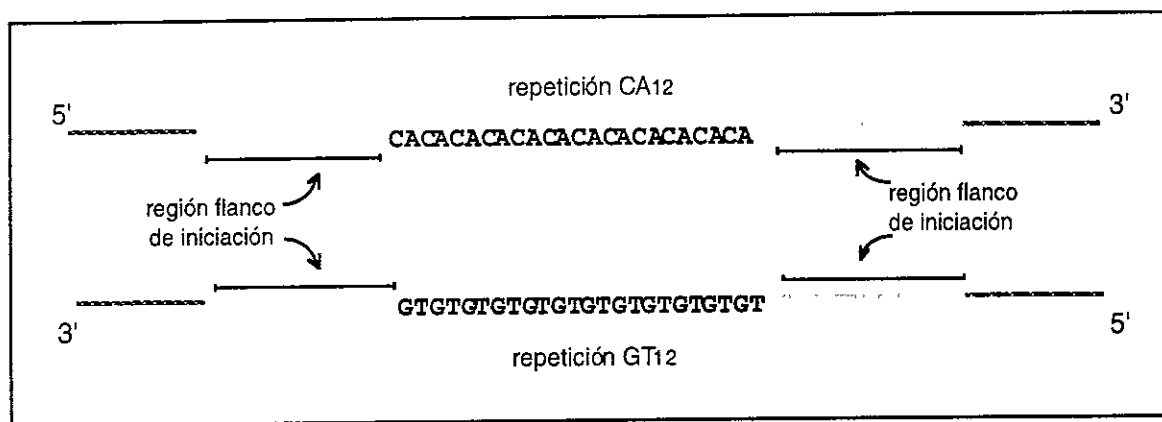


Fig.5. Representación esquemática de una secuencia microsátelite y regiones flanco (modificación a González-de-León *et al.* 1995; Griffiths *et al.* 1996).

Revelan herencia codominante mendeliana (Morgante y Olivieri 1993), manteniendo una gran conservación en las progenies (Saghai-Maroofo *et al.* 1994).

Exhiben un enorme polimorfismo en los *loci* que amplifican (Tautz 1989; Shattuck-Eidens *et al.* 1990; Morgante y Olivieri 1993; Lee *et al.* 1995; Plaschke *et al.* 1995; Powell *et al.* 1996), posible resultado de la existencia de diferentes números de copia de tales repeticiones en varios alelos en un *locus* (Beckmann y Solter 1990).

Regiones genómicas que registran hipervariabilidad, han sido descritas en numerosos organismos eucarióticos (Nakamura *et al.* 1987; Tautz 1989; Litt y Luty 1989; Weber y May 1989; Hamada *et al.* 1982; Stallings *et al.* 1990).

²¹ En inglés, *mer*. Sufijo que denota polimerización.

4.1.1 Reglas de designación

Las reglas que describen la designación para repeticiones en otros organismos eucarióticos (Weber 1990) brindan la pauta para la clasificación de secuencias de repetición en las plantas (Morgante y Olivieri 1993):

- ⊙ *Perfectas*. No existen interrupciones en el orden de las repeticiones de dinucleótidos.
- ⊙ *Imperfectas*. Aparecen una o más interrupciones en el orden de las repeticiones.
- ⊙ *Compuestas*. El orden de repetición de una clase de secuencia es adyacente (no intercalado) de otra clase.

4.1.2 Distribución genómica

Los microsatélites se encuentran distribuidos a todo lo largo del genoma eucariótico de manera abundante y uniforme (Tautz y Renz 1984; Weber y May 1989; Litt y Luty 1989; Powell *et al.* 1996), principalmente en las regiones cercanas a los centrómeros y telómeros (Darnell *et al.* 1990; Weissenbach *et al.* 1992; Griffiths *et al.* 1996).

Se ha calculado que una secuencia microsatélite aparece con una regularidad aproximada de 1 cada 10 kb en humanos (Tautz 1989) y 1 cada 50 kb en plantas (Morgante y Olivieri 1993). En genomas vegetales, se considera una amplia presencia de repeticiones de tri- y tetranucleótidos, con 1 cada 62 kb; en promedio, para monocotiledóneas 1 cada 65 kb y en dicotiledóneas 1 cada 21 kb (Wang *et al.* 1994). Particularmente, en maíz (*Zea mays*, L.) se ha establecido la detección de ~1.0 SSR cada 59 kb de ADN genómico (Tabla 5).

La localización de los microsatélites de trinucleótidos es usual en secuencias de codificación y en intrones (Tabla 6). Considerando la composición estructural del código genético (Watson *et al.* 1987), es de esperarse que la mayor cantidad de microsatélites localizados dentro de las secuencias de codificación sean repeticiones de este tipo (Morgante y Olivieri 1993). Estudios realizados sobre numerosas especies vegetales, definen que las repeticiones de trinucleótidos están conformadas en una gran proporción por guanina y citosina (Wang *et al.* 1994).

Los cálculos del número de microsatélites por genoma en maíz y otras especies vegetales son reveladores en cuanto al vasto número de secuencias de este tipo (Senior y Heun 1993). Específicamente en maíz, se registran 10^4 - 10^5 copias microsatélites $(GT)_n$ y $(AG)_n$ (Condit y Hubbell 1991); en tanto que para las secuencias $(AC)_n$ y $(AG)_n$, existen 5×10^3 y 3×10^5 , respectivamente (Cregan 1992).

4.1.3 Función

La particular abundancia y distribución de los microsatélites en numerosos genomas eucarióticos (Hamada *et al.* 1982; Nordheim y Rich 1983; Stalling *et al.* 1991) sugiere la intervención de cierto mecanismo para su permanencia —como los de amplificación de gen, intercambio de cromátidas hermanas o conversión de gen (Watson *et al.* 1987)—. Los posibles funciones que justificarían tal permanencia estarían relacionadas con procesos tales como:

- i. **Apareamiento cromosómico** (Rieger *et al.* 1976). Es la asociación altamente específica de cromosomas homólogos cercanos. En ciertos tipos de apareamientos cromosómicos homólogos, como: en el apareamiento meiótico, conformarían la secuencia de los *loci* de contacto o cigómeros²²; en el apareamiento no específico de cromosomas, específicamente en las fusiones heterocromáticas, donde se combinan al azar regiones de heterocromatina (es decir, de zonas ricas en ADN satélite).

²² Cualquiera de las unidades hipotéticas en cada cromosoma, cuya función en eucariontes sería la de iniciación de apareamientos cromosómicos (Rieger *et al.* 1976).

Tabla 5. Número y distancias promedio entre microsatélites en especies vegetales (Megapares de bases/Genoma Haploide, Mpb/C)

Especies	Contenido de ADN nuclear		ADN verificado		Microsatélites ^a	
	Mpb/C	%G+C	Registros	Longitud (kb)	Número	Distancia (kb)
<u>Algas</u>		59.2	48	116.7	6	19.4
<u>Monocotiledóneas</u>						
<i>Hordeum vulgare</i>	4 873	48.6	59	156.4	1	156
<i>Oryza sativa</i>	431	45.9	168	208	9	23
<i>Triticum aestivum</i>	15 966	48.0	97	144	7	20.6
<i>Zea mays</i>	2 504	48.3	205	410.5	7	58.6
		X(mono)=47.7				X= 64.6
<u>Dicotiledóneas</u>						
<i>Arabidopsis thaliana</i>	145	59.2	214	424.2	10(6)	42.4(70.7)
<i>Brassica</i>	759	40.0	39	76.1	3(1)	25.4(76.1)
<i>Glycine max</i>	1 115	35.2	101	199.7	13(11)	15.4(18.2)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	954	35.2	94	195.3	8(6)	24.4(32.6)
<i>Nicotiana</i>	3 960	37.1	96	203.8	13(12)	15.7(17.0)
<i>Petunia</i>	1 274	37.0	46	66	6(5)	11(13.2)
<i>Pisum sativum</i>	4 172	35.5	51	105.9	6	17.1
<i>Solanum tuberosum</i>	1 730	34.0	85	145.8	8	18.2
		X(di)= 39.2				X(di)= 21.2
Otras especies			309	1 287.1	33(25)	39.0(51.5)
Total			1 612	3 026.2	130(109)	23.3(27.8)

^a Los números entre paréntesis cuando se removieron los SSR-mono, en caso que los hubiere. Modificación a Wang *et al.* 1994.

Tabla 6. Distribución de microsatélites respecto a secuencias de codificación

Tipo de microsatélite	Flanco 5'	Intrones	Flanco 3'	Sin traducción		Secuencias de codificación	Otras
				ARNm 5'	ARNm 3'		
Dinucleótido	23	22	8	2	13	-	2
AT	21	14	8	-	7	-	2
AG/TC	2	7	-	2	6	-	-
AC/TG	-	1	-	-	-	-	-
Trinucleótido	7	6	2	8	3	12 ^a	2

^a Obtenidos de clonas de ADNc, no de clonas genómicas. Modificación a Morgante y Olivieri 1993.

- ii. **Movimiento de cromosomas.** La motilidad que presentan los cromosomas durante la mitosis y la meiosis son fundamentales para la separación en la anafase I de las cromátidas (mitosis y meiosis II) o de los cromosomas (meiosis I). Durante la mitosis, los cromosomas se orientan por el centrómero en relación a los polos (auto-orientación), para luego alinearse individualmente en el ecuador durante la metafase. En tanto, durante la meiosis se efectúan el apareamiento de los cromosomas homólogos y la denominada repulsión (durante el diploteno), los cuales involucran movimiento. En todos los procesos referidos, los centrómeros son esenciales; al conformar en gran medida a estos últimos, se juzga responsables a este tipo de secuencias de repetición (Griffiths *et al.* 1996).
- iii. **Contracción cromosómica.** Al parecer, las zonas centroméricas son una suerte de eje nodal al participar en el engrosamiento y adelgazamiento por enrollamiento de los cromosomas durante la mitosis y la meiosis (condensación cromosómica) (Rieger *et al.* 1976; Strickberger 1976; Griffiths *et al.* 1996).
- iv. **Zonas de recombinación alta** (McClintock 1931; McClintock *et al.* 1981; Kobori *et al.* 1986; Bullock *et al.* 1986). Siendo la recombinación en eucariontes (como el maíz) con reproducción sexual una función de cuatro procesos fundamentales —entrecruzamiento cromosómico, distribución aleatoria de cromosomas y de cromátidas durante la meiosis, actividad de transposones, y combinación aleatoria de los gametos durante la fertilización—, se consideran este tipo de secuencias ubicadas cercanas o asociadas con aquellas zonas donde se verificarían en gran medida procesos de alta recombinación.
- v. **Integridad estructural.** Por su ubicación cercana a los centrómeros, los microsatélites podrían ser importantes sitios en el reconocimiento de secuencias durante la replicación y la distribución cromosómica (Watson *et al.* 1987; Helentjaris 1987). En tanto, por localizarse en regiones teloméricas, servirían como sitios de unión con proteínas cromosómicas (Darnell 1990).
- vi. **Regulación y expresión de genes** (Hamada *et al.* 1984; Murphy *et al.* 1989; Bell y Torney 1993; Vergnaud 1989) por su supuesta asociación con exones.
- vii. **Determinación de sexo** (Singh *et al.* 1980). Se han localizado abundantes números de secuencias de repetición de esta categoría en cromosomas sexuales, los que les conferiría una relación con la determinación de sexo.

4.1.4 Origen

En teoría, el origen de los microsatélites y de las secuencias flanco sería ocasionado por varios eventos moleculares, a enunciar:

- ⊙ **Cambios de base.** La adición o pérdida de una o más bases en una unidad de repetición posiblemente sea el resultado de entrecruzamiento cromosómico (*crossing over*) desigual en la recombinación durante la mitosis, lo que originaría números de repeticiones impares en la siguiente generación (Weising *et al.* 1988; Morgante y Olivieri 1993; Bell y Torney 1993).
- ⊙ **Mal apareamiento** en el desprendimiento de cadenas durante la replicación del ADN (Levinson y Gutman 1987) o errores en tal replicación (Smith 1976).
- ⊙ **Mutaciones puntuales** en las secuencias no codificantes del genoma (Shattuck-Eidens *et al.* 1990).
- ⊙ **Actividad de los elementos de transposición**, principalmente en intrones (Shattuck-Eidens *et al.* 1990).
- ⊙ **Eventos masivos de inserción/supresión.** En maíz, el aglomeramiento de transposones en ciertas regiones del genoma es indicio de la inserción preferencial en sitios específicos o, de la reinserción en sitios vecinos cercanos —tienden a, una vez insertos, excisarse y reinsertarse— (Shattuck-Eidens *et al.* 1990).
- ⊙ **Regulación de tiempo de replicación cromosómica.** La replicación de diferentes regiones cromosómicas se efectúa en diferentes períodos de tiempo, lo que permite una mayor o menor variabilidad de secuencias (Wolfe *et al.* 1989).

4.2 Evaluaciones experimentales

Los pares de iniciadores específicos para microsatélites (iniciadores *forward*, *reverse*; en inglés, iniciadores adelante, reversa) son diseñados para la amplificación por PCR en función de las secuencias flanco de los microsatélites (Fig.5). Tales regiones son especialmente importantes, puesto que generalmente se mantienen entre individuos de la misma especie, aun cuando los microsatélites son secuencias extremadamente polimórficas. Se ha sugerido que, en maíz, el tamaño de la duplicación flanco que acompaña a los microsatélites posee repeticiones invertidas en las partes terminales y restricciones en la homología de secuencias posiblemente debido a inserciones masivas de transposones (Doring y Starlinger 1984; Shattuck-Eidens *et al.* 1990).

Experimentalmente, los microsatélites son analizados por amplificación (mediante la PCR) de una región genómica pequeña que contiene la secuencia de repetición, y el cálculo del tamaño de la longitud de la repetición se efectúa por separación en gel de agarosa o poliacrilamida (o de poliacrilamida desnaturalizante), para incrementar la resolución con que se verifican los alelos (Johnson y Grossman 1977; Sambrook *et al.* 1989; Morgante y Olivieri 1993) (Figura 6). Para esto, sólo se requiere una cantidad de ADN del orden de picogramos, siendo posible utilizar la tecnología desarrollada para la automatización de muestras amplificadas por PCR. La variación en el número de repeticiones en serie resulta en productos de reacción con diferente longitud, lo que permite detectar diferentes alelos por *locus* (Morgante y Olivieri 1993; Senior y Heun 1993; Kijas *et al.* 1995; Plaschke *et al.* 1995; Röder *et al.* 1995) (Fig.6).

Es posible utilizar métodos radioactivos y no radioactivos para observar los polimorfismos de longitud (*en bandas*) en los geles: por tinción con bromuro de etidio y visualización por luz ultravioleta (Sambrook *et al.* 1989), por tinción con azul brillante de cresilo (Santillán-Torres y Ponce-Noyola 1993), y/o por tinción con nitrato de plata (Sanguinetti *et al.* 1994).

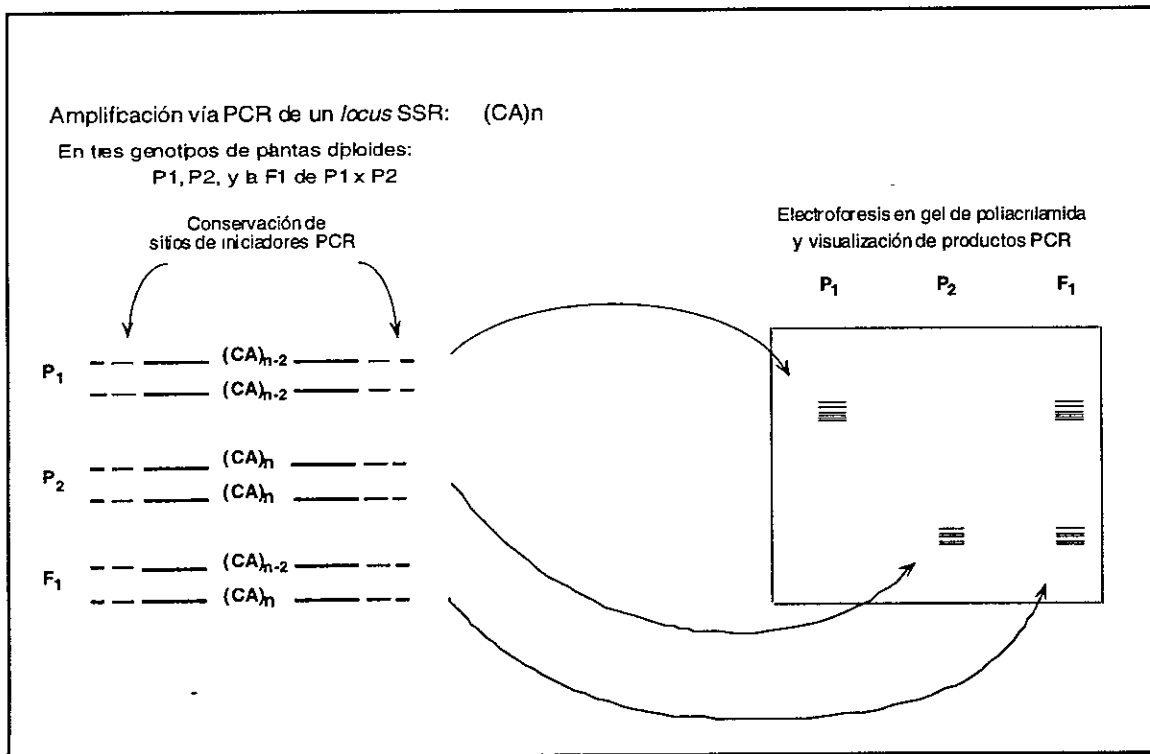


Fig.6. Generación y visualización de los polimorfismos de longitud de las repeticiones de secuencia simple (modificación a Cregan 1992).

4.2.1 Desarrollo de iniciadores

Varias propuestas existen para el desarrollo de los iniciadores microsatélites utilizados en la amplificación vía PCR:

- A. Escrutinio en los bancos de ADN genómico por hibridación con oligonucleótidos SSR (Cornall *et al.* 1991; Akagi *et al.* 1996; Brown *et al.* 1996; Powell *et al.* 1996).
- B. Búsqueda de microsatélites en bases de datos de ADN públicas (Beckmann y Soller 1990; Cregan 1992; Wu y Tanksley 1993; Wang *et al.* 1994; Saghai-Marooof *et al.* 1994; Brown *et al.* 1996).
- C. Empleo de iniciadores específicos (para microsatélites) desarrollados en especies relacionadas (Litt y Luty 1989; Weber y May 1989; Tautz 1989; Kijas *et al.* 1995; Brown *et al.* 1996).
- D. Obtención de una secuencia flanco mediante un iniciador de secuenciación, usando como base la secuencia de un microsatélite. Se diseñan iniciadores que contengan la secuencia microsatélite en la parte 5' terminal y cualquier otro patrón de nucleótidos (que no guarde un orden de secuencia microsatélite) en la parte 3' terminal (Browne y Litt 1992).
- E. Identificación de secuencias microsatélites en bancos genómicos mediante sondas originadas de RFLPs (Jeffreys *et al.* 1985a) o por reamplificación de ISSRs (esto es, por clonación de la banda de interés y posterior reamplificación) (Zietkiewicz *et al.* 1994).
- F. Escrutinio de bancos de fagos con sondas marcadas, purificación e identificación de clonas, aislado con endonucleasas, clonación y minipreparaciones de plásmidos (Taramino y Tingey 1996; Taramino *et al.* 1997).

Asimismo, ya se han desarrollado novedosas técnicas para el enriquecimiento de secuencias microsatélites (Powell *et al.* 1996):

- ⊙ *Cromatografía por afinidad del ADN*. Generación de fragmentos por sonicación o digestión por endonucleasas de ADN genómico, desnaturalización y captura por hibridación a membranas con oligonucleótidos, elución y clonación.
- ⊙ *Formación de duplos por hibridación*. Generación de fragmentos por sonicación o digestión por endonucleasas, desnaturalización e hibridación a un oligonucleótido bionitilado con patrón de repetición complementario a la secuencia; y clonación o amplificación selectiva por PCR (Kijas *et al.* 1994; Taramino y Tingey 1996; Taramino *et al.* 1997).
- ⊙ *Formación de triple hélice*. Utilización de ADN (fragmentos genómicos o insertos de ADN clonados) y oligonucleótidos selectivos.
- ⊙ *Síntesis de segunda cadena con oligo-iniciación*. Generación de patrones de una cadena en *E.coli*; síntesis de segunda cadena iniciada con oligonucleótido selectivo; y transformación en *E.coli* estándar para reclonación de duplos.

Se considera que se han identificado alrededor de 186 secuencias microsatélites específicas para maíz (*Zea mays*, L.) (al año de 1996), todas las cuales pueden ser consultadas en bases de datos públicas (EMBL, MaizeDB y GenBank) (Senior *et al.* 1996). En el sector privado, existen conglomerados de laboratorios (p.e., "Linkage Genetics", "EST approach") donde se efectúa el desarrollo masivo de iniciadores via bancos de fagos y clonas, el escrutinio con programas computacionales (p.e., Primer[®]), la examinación de los SSRs, la secuenciación en masa y la distribución rápida de los iniciadores. Todo lo cual ha permitido establecer miles de secuencias en corto tiempo. Hasta ahora, se ha restringido su difusión a quienes se encuentran en tal red privada, con miras a la apertura al sector público (Helentjaris y Fincher 1996; Lynn Senior, comunicación personal).

La aplicación cada vez mayor de los microsatélites en proyectos de cartografía, estudios de ligamiento, análisis de germoplasma, ensayos *intra* e *inter* poblacionales, e identificación de cultivares de un sinnúmero de especies vegetales, que incluyen *Arabidopsis thaliana*, *Daucus carota*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare*, *Nicotiana tabacum*, *Pisum sativum*, *Oryza sativa*, *Solanum tuberosum*, y *Zea mays* (Cregan 1992, Senior y Heun 1993; Wu y Tanksley 1993; Goloubinoff *et al.* 1993; Saghai-Marooof *et al.* 1994; Lee *et al.* 1995; Senior *et al.* 1995, 1996; McCouch *et al.* 1997; Chen *et al.* 1997; Smith *et al.* 1997), es consecuencia de las ventajas que ofrece esta tecnología de marcaje genético. Éstas enúncianse:

- ⊙ Verificación de alto polimorfismo; sumamente informativos para especies y cruza vegetales derivadas de cultivares filogenéticamente relacionados.
- ⊙ Análisis rápido mediante evaluaciones PCR.
- ⊙ Herencia codominante mendeliana.
- ⊙ Distribución profusa en el genoma.

La principal desventaja de los marcadores microsatélites es la identificación y secuenciación de las regiones genómicas que entrañan este tipo de secuencias, cuestiones que exigen tiempo y recursos (Cregan 1992; McCouch *et al.* 1997).

En el siguiente capítulo se consideran diferentes aspectos tanto de la cartografía cromosómica con marcadores moleculares como de una breve relación de los estudios de la diversidad genética del maíz y del teocintle. Esto, a efecto de brindar una base teórica —por demás modesta— que permita comprender más claramente los conceptos que rigen la confección de mapas de ligamiento genético, e ilustrar las ventajas relativas y las dificultades que entraña el análisis de la diversidad alélica mediante este sistema de marcaje molecular.

5 - APLICACIONES DE LOS MICROSATÉLITES

El uso de microsátélites en la cartografía vegetal es influencia directa de los extensos estudios cartográficos de diversos genomas de mamíferos (Weissenbach *et al.* 1992; Dietrich *et al.* 1992; Serikawa *et al.* 1992). La presencia de tales secuencias de repetición está ampliamente documentada en especies vegetales (Weising *et al.* 1989; Shattuck-Eidens *et al.* 1990; Condit y Hubbell 1991; Cregan 1992; Thomas y Scott 1993; Langercrantz *et al.* 1993).

Importancia creciente adquieren los microsátélites como marcadores moleculares en la cartografía del maíz (Akkaya *et al.* 1992; Morgante y Olivieri 1993; Zhao y Kochert 1993; Senior y Heun 1993; Wu y Tanksley 1993; McCouch *et al.* 1997; Smith *et al.* 1997). Se ha reportado la incorporación de la información del polimorfismo obtenida con marcadores microsátélites, en mapas de ligamiento construidos previamente con RFLPs (Senior *et al.* 1995,1996; Smith *et al.* 1997), lo que resulta en mapas con mayor saturación del genoma con marcadores.

En otros proyectos cartográficos con microsátélites (Taramino y Tingey 1996; Smith *et al.* 1997) se han explorado polimorfismos en varios cultivares de maíz, para luego aislarles y caracterizarles a fin de comprobar su utilidad como marcadores moleculares en cualquier población de maíz.

5.1 Cartografía

5.1.1 Consideraciones teóricas

El ligamiento se define como la herencia conjunta de dos *loci* marcadores o dos genes ubicados en el mismo cromosoma o secuencia de ácido nucleico —*i.e.*, estructura de ligamiento—, los cuales no se distribuyen independientemente en la meiosis (Morgan 1910; Griffiths *et al.* 1996). Dos marcadores genéticos (p.e., los pares alélicos *A/a* y *B/b*) presentarían ligamiento si las combinaciones de los progenitores utilizados en un determinado experimento muestran una tendencia a permanecer juntos; esto es, la proporción de los denominados recombinantes (*Ab* y *aB*) sería menor a la proporción de las combinaciones de los progenitores (*AB* y *ab*). Por otra parte, si dos genes o *loci* marcadores se localizaran en estructuras de ligamiento no homólogas, segregarían independientemente y aparecerían los tipos de recombinación en igual frecuencia (Rieger *et al.* 1976).

Un grupo de ligamiento es un grupo de *loci* que puede ser dispuesto en un orden lineal y que relativamente representa los diferentes grados de ligamiento entre ellos. Grupos de ligamiento específicos corresponden a cromosomas específicos (o estructuras de ligamiento). El número de grupos de ligamiento es limitado, pues el número máximo equivale al número de cromosomas por genoma —p.e., el número haploide de cromosomas en organismos diploides.

Consecuentemente, un mapa de ligamiento genético representa el orden lineal de los genes (o *loci* donde se localizarían) que corresponden al grupo de ligamiento asociado con un cromosoma. El entrecruzamiento y los valores de recombinación se emplean para demostrar un orden definido de los genes o de los *loci* en serie en un cromosoma, y proveen de un índice de la distancia relativa entre cualesquier par de genes o de *loci* (Lander y Botstein 1989; Lorieux 1994; Knapp 1994).

En síntesis, la construcción de un mapa por marcadores consiste, sucesivamente (Lorieux 1994), en:

- a) el cálculo o estimación de las distancias de recombinación entre los marcadores,
- b) el establecimiento de los marcadores en grupos de ligamiento, y
- c) el orden de los marcadores en determinados grupos de ligamiento.

5.1.2 Elementos para un proyecto cartográfico

Desde las primeras décadas de este siglo, se ha teorizado acerca del uso de marcadores y de mapas de ligamiento genéticos para agilizar el proceso del mejoramiento vegetal, identificar y seleccionar "genes menores" ligados con "genes mayores", discernir la contribución de ciertas regiones del genoma a ciertos caracteres, etc. (Sax 1923).

La cartografía con marcadores moleculares se fundamenta en la localización de ligamiento entre los marcadores (p.e., RFLP, SSR, STS, RAPD o AFLP) y los genes de interés. Tal ligamiento permitiría inferir la presencia de un gen de interés si se identifica tal o cual marcador en un *locus* en particular. Existen numerosos caracteres controlados por genes únicos que son transmitidos frecuentemente de un reservorio genético (*genetic background*) a otro por los fitomejoradores (p.e., los genes que conferirían resistencia a patógenos) en numerosas generaciones. Los marcadores moleculares pueden auxiliar en la reducción del número de generaciones por la selección precisa de sólo aquellos individuos a quienes se hayan transferido el(los) caracter(es).

Un gran número de caracteres son consecuencia de la acción conjunta de varios genes, denominados poligénicos o cuantitativos (p.e., en maíz, el rendimiento de grano o la tolerancia a sequía). En realidad, por ahora no se conoce en demasía acerca del número, posición cromosómica o efectos de interacción de los genes que controlan tal expresión. A pesar de que la teoría y técnicas de la genética cuantitativa han demostrado ser útiles en el estudio de los caracteres cuantitativos (Falconer 1960; Soller y Brody 1976; Tanksley *et al.* 1982; Edwards *et al.* 1987; Stuber 1992), éstos continúan siendo difíciles de manipular en los programas de fitomejoramiento. De discernirse los componentes genéticos individuales, podría ser posible manejarlos con la eficiencia de los caracteres de genes únicos. Los marcadores moleculares han demostrado ser una de las herramientas que servirían en la solución de este problema (Ribaut *et al.* 1996; Hoisington *et al.* 1996; Groh *et al.* en prensa).

Los objetivos de investigación definen la estrategia experimental a seguir en un proyecto cartográfico, teniendo en consideración la importancia del carácter, la dificultad y el costo del escrutinio del mismo, así como la ventaja estratégica de utilizar cierto tipo de marcadores moleculares en una determinada población a generar.

Construir un mapa de ligamiento para una especie en particular requiere, primeramente, del desarrollo de una población en segregación²³ a partir de una cruce entre dos plantas genéticamente diferentes para uno o más caracteres de interés, siendo una la fuente del carácter deseado (progenitor donador) y otra aquella a mejorar (progenitor recurrente) (Tanksley *et al.* 1989). Ya que una cantidad muy amplia de poblaciones puede generarse, escoger el tipo más adecuado dependerá de la resolución que se desee tener y de la facilidad de generarla. Los aspectos esenciales que deben considerarse son:

- I. **Polimorfismos moleculares entre progenitores.** Es condición imperativa que existan alelos diferenciables entre los progenitores.
- II. **Selección de la población segregante.** Debe generarse primero la población que producirá segregación en los *loci* deseados, para después construir el mapa de ligamiento. Existen diferentes tipos de poblaciones, cuyo desarrollo dependerá del objetivo del proyecto:

²³ La segregación genética es la separación de los pares alélicos entre sí, y su distribución a diferentes células, normalmente en la meiosis o mitosis. Sólo es observable en genotipos con pares heterocigóticos de alelos (Reiter *et al.* 1976).

- A. *Retrocruza* ($BC_1F_1^{24}$). Población generada para recobrar lo más posible del genotipo deseado al progenitor recurrente, luego de la introducción de el(los) gen(es) de interés del progenitor donador (Fig.7). Luego de varios ciclos de retrocruza, se obtienen plantas casi idénticas genéticamente al progenitor recurrente, con la excepción de que los genes para el carácter "objetivo" han sido incorporados al genoma (Tanksley *et al.* 1989). Son útiles al emplearse marcadores dominantes (p.e., RAPDs o AFLPs) (Lorieux 1994; González-de-León *et al.* 1995). Mediante estas poblaciones, es posible discernir la frecuencia de recombinación individual masculina de la femenina (detección de la frecuencia de recombinación para uno solo de los gametofitos) (Lorieux 1994).
- B. *Población segregante filial 2* (F_2). Generada por la autofecundación de la generación filial F_1 (Fig.7). Brinda información correspondiente a todos los genotipos segregantes posibles en un *locus* en particular (Lander *et al.* 1987; Beavis y Grant 1991). De tal suerte, las F_2 son sumamente informativas cuando se analizan con marcadores codominantes (p.e., RFLPs y SSRs), puesto que permiten detectar de manera más acuciosa el ligamiento de los *loci* y el cálculo de las recombinaciones totales de las meiosis del microgametofito y del macrogametofito (lo que no permitiría una retrocruza) (Lorieux 1994).
- C. *Líneas endogámicas recombinantes* (RILs²⁵). A partir de ciertos individuos de una F_2 se deriva una línea poblacional en (por lo menos) 5 a 6 generaciones por autofecundaciones sucesivas (Fig.7). Ya que las RIL contienen una combinación diferente de bloques de ligamiento a partir de los progenitores originales, cada uno de los bloques ofrecería una base para el análisis de ligamiento de uno (o varios) carácter(es) con uno (o varios) marcador(es). Supuestamente, poseen ~100% de homocigosis, aunque se ha demostrado que ciertas regiones permanecen heterocigotas mayor tiempo del esperado (Burr *et al.* 1988; Burr y Burr 1991); luego de la endogamia de varias generaciones, se tendrían *fijados* pequeños bloques de ligamiento de los alelos del progenitor (Burr *et al.* 1988). Los mapas generados a partir de este tipo de poblaciones poseen mayor resolución que aquellos desarrollados por F_2 o retrocruzas y permitirían la localización de *loci* de caracteres cuantitativos o complejos (QTLs²⁶). Revelan mayor información que las retrocruzas para el estudio de distancias pequeñas (<12.5 cM²⁷), pero no así para distancias grandes; son útiles cuando se emplean mapas saturados (con una distribución uniforme de grandes números de marcadores en todo el genoma a estudiar). Con estas poblaciones es posible realizar un gran número de mediciones para determinar caracteres cuantitativos, contrariamente a con una F_2 —una sola medición por planta.
- D. *Líneas de haploides duplicados*. Un haploide duplicado es definido como un organismo cuyas células gaméticas poseen dos conjuntos de cromosomas, ambos provenientes de una misma célula madre cuando se aplica un agente inductor de la poliploidia²⁸ (p.e., químicos: colchicina, acenapteno, cloruro de etilmercurio o sulfonilamida) a tejido meristemático (u otras fases de crecimiento de una planta) (Allard 1960). Las líneas derivadas de estos

²⁴ En inglés, *Backcross*.

²⁵ En inglés, *Recombinant Inbred Lines*.

²⁶ En inglés, *Quantitative Trait Loci*.

²⁷ cM, centimorgan.

²⁸ Condición de aquellas células y tejidos somáticos, así como individuos, que poseen tres (triploide), cuatro (tetraploide), cinco (pentaploide), o más conjuntos cromosómicos en vez de dos (como en los diploides) (Reiter *et al.* 1976).

organismos se genera por duplicación del genoma: son homocigotas que, luego de sucesivas replications en el campo, pueden brindar mapas enormemente precisos (Murigneux *et al.* 1993; González-de-León 1995) (Fig.7). Al analizarse con marcadores dominantes, el método del cálculo de las frecuencias de recombinación es la misma que en una retrocruza, así como la precisión de tal cálculo para uno solo de los genotipos a estudiar (Lorieux 1994).

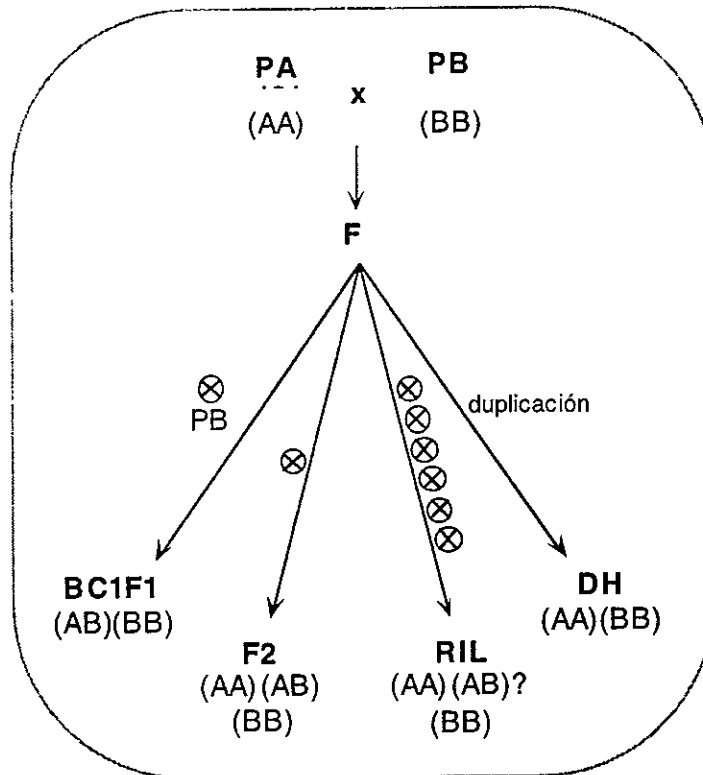


Fig.7. Esquema de las poblaciones sujetas a cartografía cromosómica, donde se muestran los genotipos (entre paréntesis) (Modificación a González-de-León *et al.* 1995).

- I. **Tamaño de población.** Determinado por el número de semillas y de marcadores disponibles, es importante establecer el número mínimo de individuos a utilizar para conocer la precisión del cálculo de las frecuencias de recombinación que permitan construir un mapa fiable. Para la obtención de resultados más precisos, se aconseja analizar el mayor número posible de individuos a fin de reducir el error estándar que se derive de las mediciones de los datos analizados (Hanson 1959). Usualmente, la progenie a evaluar se constituye de >100 individuos a fin de reducir el error estándar (Tanksley *et al.* 1989), aunque hay autores que consideran suficiente un número de 50 (Helentjaris *et al.* 1986; Kochert 1989) (Fig.8).

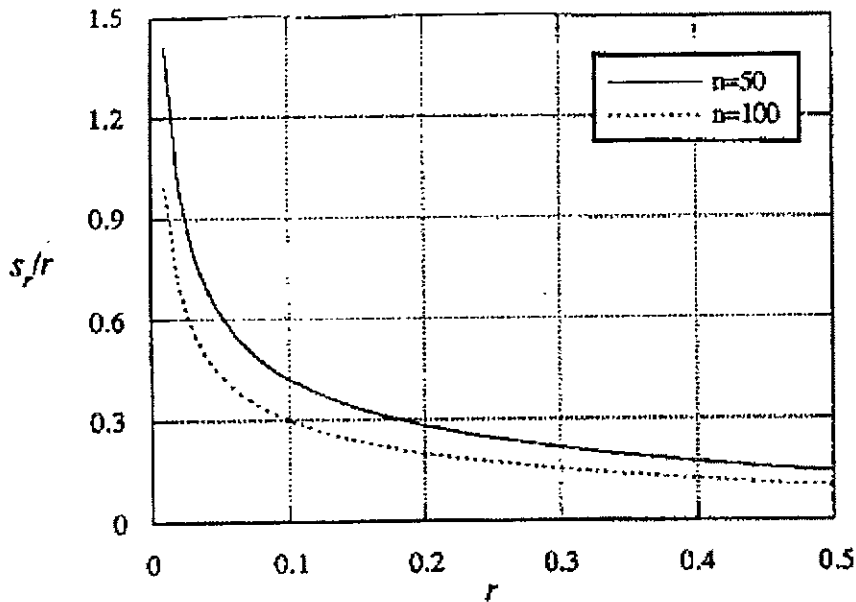


Fig.8. Cociente del error estándar de la frecuencia de recombinación (s_r/r) en una retrocruza. Para los valores "más factibles" de r (frecuencia de recombinación), se calcula un cociente muy grande ($n = 100$); se aumenta cuando el tamaño n de la población disminuye ($n = 50$) (Lorieux 1994).

5.1.3 Análisis del ligamiento genético

Una unidad de mapa (*map unit*, m.u.) se concibe como la relación de la frecuencia de recombinación entre los genes o los *loci* (Watson *et al.* 1987; Griffiths *et al.* 1996); o, un evento de recombinación con una frecuencia de 1%. De común, es posible referir a una unidad de mapa como centimorgan (cM) (Haldane 1919; Griffiths *et al.* 1996).

Teóricamente, el grado de ligamiento entre dos *loci* depende de la frecuencia de recombinación que entre ellos exista. La identificación o manipulación de alelos en un "locus objetivo" requiere ligamientos con los marcadores del orden de <5 cM y una distribución uniforme de *loci* marcadores con intervalos de ~20 cM en todo el genoma (Tanksley 1983).

El análisis de la eventual cosegregación entre dos marcadores determinados se realiza mediante pruebas estadísticas: la distribución χ^2 (ji-cuadrada) y el *LOD score*.

5.1.3.1 Distribución χ^2

La ji-cuadrada (χ^2) es una distribución probabilística que resulta de la suma de cuadrados de variables aleatorias independientes, cada una de las cuales tiene una distribución normal estándar.

Una variable aleatoria χ^2 se genera por la suma de variables aleatorias independientes normal estándar elevadas al cuadrado. Al número de clases de variables independientes en la suma se les denomina *grados de libertad*, y son el parámetro de la distribución (Lorieux 1994). Este concepto resulta, en el análisis estadístico de resultados experimentales, de relacionar el número total de individuos observados en el experimento con una cantidad esperada. A esta cantidad contribuyen las clases componentes en el experimento, algunas de las cuales son variables, o *libres*, con respecto de sus números (Strickberger 1976).

Genéticamente, las clases esperadas o calculadas en los *loci* en segregación (cocientes mendelianos) estarían en función del tipo de población sujeta a estudio, así como de los marcadores (codominantes o dominantes) utilizados (Tabla 7). Éstas se contrastan con la segregación observada:

$$\chi^2 = \sum_{i=0}^n \frac{(\text{Observado}_i - \text{Esperado}_i)^2}{\text{Esperado}_i} \quad (1)$$

$$\chi^2 = \sum_{i=0}^n \frac{\left[\left| (\text{Observado}_i - \text{Esperado}_i) \right| - 1/2 \right]^2}{\text{Esperado}_i} \quad (2)$$

La ecuación 1 deberá usarse para todos los grados de libertad mayores a 1, en tanto que la ecuación 2 solamente cuando exista un solo grado de libertad. La reducción de 1/2 del valor absoluto de la desviación *observado-esperado* se conoce como la "corrección de Yates", la cual se añade a las determinaciones de χ^2 cuando el número de cualesquiera de las clases esperadas es pequeña (Strickberger 1976).

Una vez que se han verificado los marcadores y determinado los genotipos, se debe establecer el ligamiento de tales marcadores. Se calcula la *significancia* de la diferencia de las clases en segregación en relación con los grados de libertad que se contemplaron. Esto es, se efectúa una prueba estadística "t" de Student (Hayes e Immer 1942; Lorieux 1994).

Posteriormente, se realiza el cálculo de la distancia entre los dos *loci* ligados. El método más simple es contar el número de entrecruzamientos que ocurrieron en tal población. Para calcular la distancia de recombinación, simplemente se divide el número total de recombinaciones detectadas por el número total de eventos meióticos.

Tres consideraciones con respecto del uso de los valores de χ^2 en genética (González-de-León *et al.* 1995):

1. Usualmente, sólo pueden aplicarse a las frecuencias numéricas, no a porcentajes o cocientes derivados de frecuencias.
2. No pueden ser, normalmente, utilizadas en distribuciones en las que el número de individuos en cualquier clase sea menor a 5 —en cuyo caso, se debe utilizar la prueba de Fisher—.
3. Ya que en la mayoría de los experimentos cartográficos se calculan cocientes de segregación para muchos *loci* en el mismo conjunto de individuos, es necesario realizar correcciones para pruebas múltiples.

5.1.3.2 Prueba de *LOD score*

El *LOD score* (*log of the odds ratio*, logaritmo del cociente de las diferencias) se interpreta como el logaritmo decimal del cociente de máxima probabilidad de ligamiento de dos hipótesis o estimaciones:

$$LOD_{\max} = \log_{10} \left(\frac{e^L(\hat{r})}{e^L(r_0)} \right)$$

donde,

- \hat{r} es el estimador de la probabilidad máxima de r ;
- L es la probabilidad logarítmica;
- $e^L(\hat{r})$ es la probabilidad máxima evaluada para \hat{r} ;
- $e^L(r_0)$ es la probabilidad evaluada cuando $r_0 = 0,5$;
- r_0 es el valor límite de r para dos marcadores que segreguen independientemente;
- r es la frecuencia de recombinación gamética.

El hecho de que se utilice el logaritmo decimal del cociente de las diferencias entre dos *loci* en particular se explica porque, de esta forma, se permite la simplificación del cálculo.

El máximo registro *LOD* para un par de *loci* es la medida tradicional del ligamiento de dos puntos (Morton 1955).

5.1.4 Análisis multipuntual

5.1.4.1 Análisis bipuntual

El análisis bipuntual es la determinación aproximativa del orden lineal de dos marcadores heredados de manera conjunta en un grupo de ligamiento; se efectúa en función de la frecuencia de recombinación existente entre ambos (Lorieux 1994).

Si se determina que tres *loci* (A , B y C) se encuentran ligados debido a la segregación conjunta, restaría establecer el orden que guardarían entre sí (Fig.9). Suponiendo que tuviesen un orden ABC , se debería verificar tal en función de la frecuencia de recombinación entre los *loci* $A-B$, $A-C$ y, finalmente, $B-C$. Cuando se sitúa el orden, las distancias que median entre los *loci* deberían ser equivalentes al valor de la distancia de los puntos más distantes entre sí (Griffiths *et al.* 1996).

Este tipo de análisis presenta algunas limitantes:

- a) existe un cierto índice de error en la atribución del orden de los grupos de ligamiento; y,
- b) las estimaciones de las frecuencias de recombinación no alcanzan la máxima precisión —son aproximativas—.

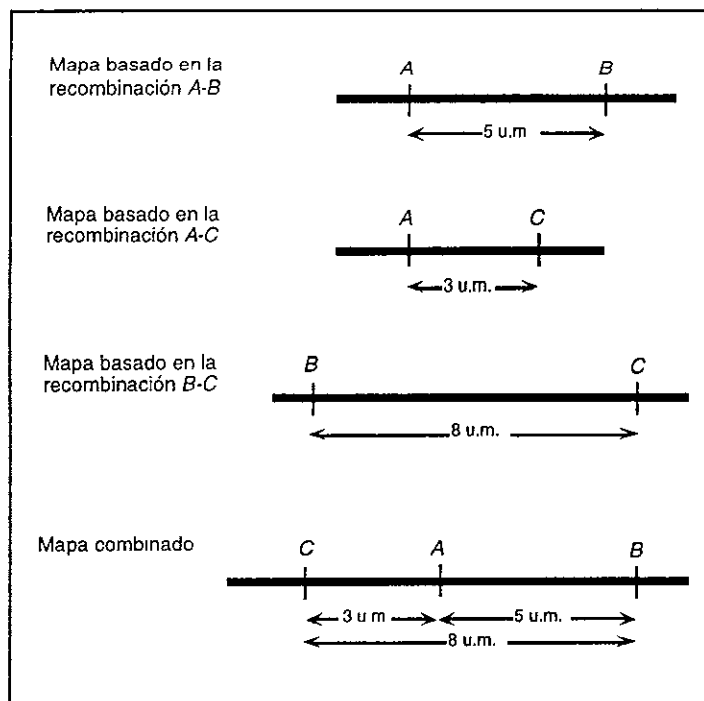


Fig.9. Esquema de posibles combinaciones de tres *loci* (A, B y C). Considerando que las distancias de mapa son aditivas, el cálculo de las distancias A-B, A-C y B-C permitiría la posibilidad ejemplificada por la distancia B-C (Griffiths *et al.* 1996).

5.1.4.2 Análisis de tres puntos

El análisis de tres puntos aporta información suplementaria al ligamiento y orden de los *loci*, puesto que considera las dobles recombinaciones que podrían efectuarse (Lorieux 1994; Griffiths *et al.* 1996).

En supuesto que tres *loci* (A, B y C) estén ligados, existiría la posibilidad de una doble recombinación: una entre A y B, y una entre B y C. Así, las hipótesis del orden de los *loci* serían: ABC (o CBA), ACB (o BCA), o CAB (o BAC). Luego de los cálculos de probabilidad máxima de cada uno de los órdenes, así como de las clases de dobles recombinantes y del logaritmo decimal del cociente de probabilidad de dos órdenes (*LOD score*), no es posible favorecer a una de las hipótesis. Morton (1955) estableció la ausencia de superioridad de una hipótesis sobre otra, a menos que el *LOD score* fuese superior o igual a 3.

5.1.4.3 Análisis de *m* puntos

El análisis multipunto (o multipuntual o de *m* puntos) brinda gran precisión al establecer el orden global de los *loci* considerando las recombinaciones múltiples. Se calculan bastantes marcadores al mismo tiempo para recolectar la información meiótica que aportan los marcadores adyacentes en lo que respecta a eventos de recombinación y establecer el orden que guardan entre sí (Lorieux 1994). Es evidente que el número de clases de segregación aumenta rápidamente con el número de marcadores estudiados simultáneamente: para *m* marcadores, existen $m!/2$ órdenes posibles (Tabla 7). De aquí la necesidad de utilizar herramientas informático-estadísticas.

Tabla 7. Tipos de población, clases de marcadores, cocientes de segregación y clases de órdenes posibles

Población	Cocientes de segregación		Número de clases en segregación
	Marcadores codominantes (A : H : B)*	Marcadores dominantes (C : D)*	
BC ₁ F ₁	0 : 1 : 1 (1 : 1)	1 : 1	2 ^m
F ₂	1 : 2 : 1	3 : 1 ó 1 : 3	3 ^m
RIL	1 : 0 : 1 (1 : 1)	1 : 1	2 ^m
DH	1 : 0 : 1 (1 : 1)	1 : 1	2 ^m

* A, progenitor A homocigoto (genotipo AA); B, progenitor B homocigoto (genotipo BB); H, heterocigoto (genotipo AB); D, marcador dominante, progenitor A (genotipo AA, AB); C, marcador dominante, progenitor B (genotipo BB, AB) (Lorieux 1994; González-de-León *et al.* 1995).

5.1.5 Funciones cartográficas

Toda vez que se hayan establecido las frecuencias de recombinación entre los diferentes *loci*, es necesario determinar la influencia de los eventos de entrecruzamiento (*crossing-over*) durante la meiosis con objeto de obtener una medición más precisa de la distancia genética entre los *loci*. La distancia genética entre dos *loci* es el número medio de recombinaciones meióticas ocurridas entre tales *loci* (Lorieux 1994).

5.1.5.1 Función de Haldane

La función de Haldane asume la interferencia negativa —léase, no interferencia— de dos *loci* en el cálculo de la distancia de mapa (Haldane y Waddington 1931). En la mayoría de los organismos, la existencia de un evento de recombinación entre dos *loci* disminuye la probabilidad de que suceda otro entrecruzamiento en regiones adyacentes en el mapa de ligamiento. Por lo tanto, las frecuencias de recombinación calculadas para tal par de *loci* adyacentes no será igual a aquella calculada para los dos *loci* distales (González-de-León *et al.* 1995) (Fig.10).

Contemplando esto, se emplea una función cartográfica para que el cálculo de la probabilidad de un *crossing-over* entre dos marcadores sea proporcional a la distancia que les separa. Tal es el caso de la función de Haldane (Haldane 1919),

$$r(x) = \frac{1}{2}(1 - e^{-2x})$$

donde,

x = valor de la distancia cartográfica entre dos *loci* (expresado en centiMorgans), considerando a r como la frecuencia de recombinación en la hipótesis de no interferencia.

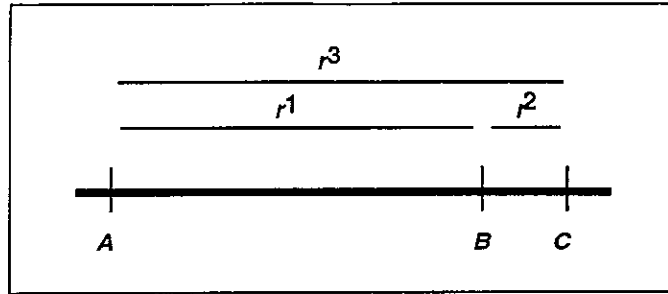


Fig.10. Diagrama que representa la ubicación hipotética de tres *loci*. Esto es, de cartografiarse tres *loci* adyacentes A, B y C, el cálculo de la distancia (en función de la frecuencia de recombinación) para el intervalo A-B, y de aquel para B-C no será, generalmente, igual al estimado para A-C (Lorieux 1994; González-de-León *et al.* 1995).

5.1.5.2 Función de Kosambi

La interferencia positiva —léase, interferencia— supone que la probabilidad de que ocurra un evento de recombinación en un segmento cualquiera depende de que otro entrecruzamiento suceda en otra región. Por consiguiente, es atribuible un valor al coeficiente de coincidencia, c . Éste es el cociente del número real de recombinaciones sobre el número teórico calculado bajo la hipótesis de ausencia de interferencia. Si se considera al valor de c como proporcional a la frecuencia de recombinación (r) y si se estima que la interferencia varía según la especie, los cromosomas y las regiones cromosómicas, entonces resulta una relación que permite la interferencia nula para $r=0.5$. Así, se tiene la función de cartografía de Kosambi:

$$r_{1+2} = \frac{r_1 + r_2}{1 + 4r_1r_2}$$

En conclusión, el “nivel de confianza” que se guarde con respecto de la construcción de un mapa de ligamiento genético estará determinado por el tamaño y tipo de la población sujeta a estudio, por las hipótesis emitidas sobre la genética de la planta, por el número y tipo de marcadores utilizados —así como del modo de segregación, sea codominante o dominante— y, finalmente, por los algoritmos usados en la determinación del orden de los marcadores y de las distancias genéticas relativas (Fig.11).

Frecuencia de
recombinación

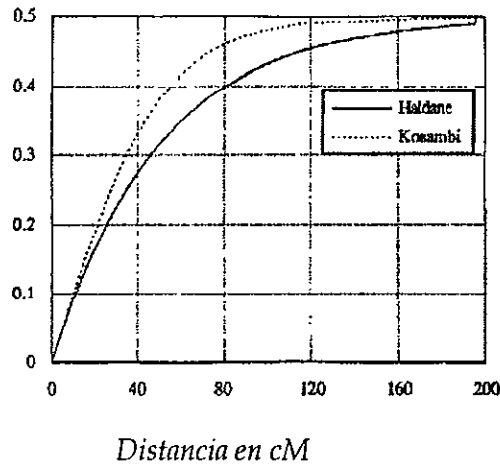


Fig.11. Relación entre la frecuencia de recombinación entre dos *loci* y la distancia genética, calculadas con dos de las funciones cartográficas más utilizadas: aquellas de Haldane y Kosambi. La función de Kosambi brinda un mapa "más compacto" que el de Haldane (Lorieux 1994).

El uso de tal o cual función cartográfica dependerá de la elección del personal, pues no existen directrices o razones por las cuales un autor científico haya empleado una en específico. Aún más, se ha argüido que éstas conducen a la contracción o expansión del mapa y, por tanto, no debieran usarse (González-de-León *et al.* 1995) (Fig.11).

Todos los algoritmos actualmente desarrollados están construidos en el supuesto de que los marcadores siguen una segregación mendeliana. Esto podría conducir a errores cuando se analizasen marcadores con segregación no mendeliana y a distorsiones de segregación (Lorieux 1994).

5.2 Diversidad genética del maíz tropical y subtropical

5.2.1 Consideraciones generales

5.2.1.1 Maíz (*Zea mays*, L.)

El maíz es el tercer cereal más importante en el mundo, luego del arroz y el trigo. Apareció ca. 9,000 años en la región definida como Mesoamérica, en un ecosistema de tierras montañosas altas (superior a los 1500 m), con inviernos fríos alternados con lluvias veraniegas. Tal región es reconocida como el centro de origen, domesticación y diversidad genética del maíz (Wellhausen *et al.* 1951).

La clasificación filogenética más aceptada de la variación genética en maíz es aquella que les divide en razas (Wellhausen *et al.* 1951; Wellhausen 1988), con nombres mexicanos (indígenas y castellanos) comunes en la región donde se le cultiva. Se considera a una raza como un "grupo de individuos relacionados por medio de suficientes características en común, de modo que se les permita reconocer como un grupo" (Wellhausen *et al.* 1951).

Los factores involucrados en la tremenda diversidad del maíz en México son: 1) presencia actual de razas primitivas o antiguas; 2) influencia de variedades exóticas de países de América del Sur en diferentes épocas de la historia del cultivo; 3) cruza naturales con el teocintle, introduciendo nuevas características y variaciones; 4) geografía y orografía; 5) selección humana; e, 6) introgresión paulatina (Wellhausen *et al.* 1951; Castillo-González 1994).

Aunados a los estudios de diversidad genética se encuentran los del origen y filogenia. El proceso evolutivo del maíz no es del todo claro, puesto que no existen formas intermedias entre el maíz silvestre y las más de 50 razas criollas de maíz que han evolucionado bajo selección dirigida en México durante los últimos 6,000 años (Wellhausen *et al.* 1951; Doebley 1990b; Castillo-González 1994). Las hipótesis más difundidas del origen son:

- a) procedencia de una forma silvestre de maíz, y
- b) evolución de una forma silvestre de teocintle o de un ancestro desconocido.

El maíz es una de la plantas más utilizadas en investigación debido a su importancia económica, agronómica, modo de reproducción y por la cantidad de información genética disponible. Hasta ahora, es una de las plantas mejor caracterizadas desde el punto de vista genético y citogenético.

5.2.1.2 Teocintle (*Zea luxurians*, L.)

Planta sumamente relacionada con el maíz en cuanto a ciertos caracteres se refiere —evidenciado especialmente por su habilidad para cruzarse con éste cultivo—, el teocintle está adaptado a regiones elevadas de temporal en México y América Central (Wilkes 1967). El nombre Náhuatl *teocintle* se asocia con la población anual (*Zea luxurians*, raza Guatemala) que crece de manera silvestre en la región suroriental de Guatemala.

Para propósitos de conservación y utilización, las variaciones naturales en el teocintle pueden caracterizarse ya sea por descripciones ecogeográficas de razas para poblaciones *in situ* (Wilkes 1967) o por clasificaciones taxonómicas (Wellhausen *et al.* 1951). Los usos más importantes de esta planta son como cultivo forrajero y en investigaciones sobre la evolución del maíz, aun cuando se ha comprobado que es una fuente de caracteres para el mejoramiento del maíz (Goodman 1988; Cohen y Gallinat 1984).

5.2.2 Estudios de la diversidad genética

La clasificación de las plantas cultivadas no ha progresado de igual manera que aquella de las especies naturales. Las razones principales estriban en la clase de variación encontrada en las dos categorías de plantas. En la naturaleza, la variación es generalmente discontinua y las especies naturales, por lo regular, han llegado a estar separadas por diferencias morfológicas bien definidas. Por el contrario, en las especies cultivadas una variación discontinua es, más frecuentemente, la excepción a la regla. De común, no existen

líneas definidas de demarcación entre las variedades o razas que componen un género cultivado. Ello ocurre especialmente cuando la variación es en su totalidad intra-específica. Esto es casi inevitable cuando la especie es además de tal naturaleza que se generan normalmente cruzamientos naturales acompañados de un continuo intercambio de plasma germinal (Wellhausen *et al.* 1951).

5.2.2.1 Marcadores morfológicos

Los primeros estudios en maíz se relacionaron con numerosas características, incluyendo color, textura, y tipo de endospermo, y coloración de aleurona. Se concluyó que la herencia de caracteres se rige de manera mendeliana (East y Hayes 1911). Las investigaciones sobre ligamiento giraron en torno de unos cuantos genes (Collins y Kempton 1920), definiéndose el orden lineal y la posición en un mapa. Posteriormente, se construyeron mapas de ligamiento con caracteres morfológicos (Rhoades 1936). Durante décadas, la clasificación de las diferentes razas de maíz y de teocintle se condujeron en función de estudios taxonómicos (Wellhausen *et al.* 1951; Bird y Goodman 1978) y geográficos (Brandolini 1968).

5.2.2.2 Estudios citológicos

Los estudios citológicos proveyeron de un vasto caudal de conocimientos mediante el estudio de las diversas fases de la mitosis y la meiosis, mediante numerosas técnicas de tinción y microscopía. Se destacan: la individualización de los cromosomas de maíz en paquiteno y anafase (McClintock 1929); el entrecruzamiento genético (McClintock 1931; Creighton y McClintock 1931); translocaciones recíprocas, inversiones y supresiones (McClintock 1931); evidencias de los quiasmas como puntos de entrecruzamiento (Beadle 1932); divisibilidad de los centrómeros (McClintock 1932). Se establecieron mapas citológicos, clasificaciones y constituciones cromosómicas del maíz y teocintle según el número y distribución de nodos cromosómicos (McClintock 1978; McClintock *et al.* 1981; Kato 1984).

5.2.2.3 Marcadores bioquímicos (isoenzimas)

Las isoenzimas se han utilizado en maíz para estudios de variación genética, así como en numerosos estudios genéticos, evolutivos y taxonómicos (Smith *et al.* 1985; Doebley *et al.* 1984, 1987). Han sido útiles en la identificación de variedades (Goodman *et al.* 1980), en la determinación de la composición genética de poblaciones y en la relación de *loci* marcadores con caracteres cuantitativos. Sin embargo, este tipo de marcadores no representa a la totalidad del genoma del maíz.

5.2.2.4 Marcadores moleculares

La cartografía de maíz por marcadores RFLP se ha beneficiado de una enorme variación en el genoma, un gran número de sondas disponibles y de la cartografía comparada (Helentjaris 1987; Helentjaris *et al.* 1986,1988; Burr *et al.* 1988; Hoisington 1989).

Los análisis moleculares por RFLP (Doebley y Stec 1993) muestran una compleja relación en poblaciones F_2 provenientes de la cruce entre maíz y teocintle: QTLs mayores en 6 brazos cromosómicos, numerosos QTLs menores en 5 brazos adicionales, e incremento de tendencias *maizoides* para 8 caracteres por alelos correspondientes al teocintle. En adición, se han realizado estudios de evolución entre el maíz y el teocintle (Doebley 1990a,b).

La utilización de los RAPD (Welsh y McClelland 1990a,b; Williams *et al.* 1990) principalmente se ha enfocado al estudio del ligamiento en regiones cromosómicas y de cartografía del maíz, y no del teocintle (Tadmor *et al.* 1995).

5.2.2.4.1 Microsatélites

Actualmente, se ha analizado el grado de variación en secuencias microsatélites para determinar la genealogía entre el maíz y el teocintle, ubicar regiones hipervariables o de alta recombinación, y establecer relaciones filológicas y huellas genéticas (Phelps *et al.* 1996; Bird *et al.* 1997; Mladenovic-Drinic y Konstantinov 1997; Smith *et al.* 1997).

Ensayos de ascendencia en genealogía en secuencias utilizando secuencias microsatélites específicos para el locus *Adh2* fundamentan el análisis de diferenciación molecular entre el teocintle (*Zea mays ssp. mexicana*) y el maíz (*Zea mays*, L.) (Goloubinoff *et al.* 1993). Igualmente, el análisis conjunto de secuencias en los loci *Adh1*, *Adh2*, *Sh1* y *O2* proveen datos para identificar la edad de divergencia para el maíz.

El análisis de diversos alelos de maíz y de algunas accesiones de teocintle (*Zea diploperennis* y *Zea perennis*) demuestra variaciones de número en secuencias microsatélites (CCA)_n y en secuencias flanco (Phelps *et al.* 1996).

Según trabajos recientes sobre la diferenciación genética del maíz, existen en la actualidad alrededor de cuarenta y nueve razas de maíz mexicano, las cuales tienden a dividirse en varios grupos (Castillo-González 1994). Algunos de éstos muestran una distribución geográfica que coincide con la de ciertos grupos culturales.

Siendo un complemento a los importantes trabajos de descripción previos, el empleo de técnicas de marcaje molecular permitirá conocer con más detalle las relaciones de las formas de la diversidad genética del maíz, así como explicaciones sobre el origen de esa diversidad, al brindar información indirecta del genoma y permitir, así, un aprovechamiento mayor de tal diversidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

1- ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

1.1 Determinación de parámetros

1.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa

El establecimiento de las cantidades precisas de cada reactivo para la amplificación de las regiones de secuencia simple se fundamentó en diversas fuentes bibliográficas (Saiki *et al.* 1985, 1988; Saiki 1989a,b; Higuchi 1989; Gelfand 1989; Mullis 1989; Newton y Graham 1995), a partir de las cuales se realizaron ajustes experimentales de las concentraciones óptimas de la polimerasa *Taq* del ADN, iniciadores y cloruro de magnesio para la optimización de la reacción (Tabla 8). [Nota: para información y detalles referentes a las compañías comerciales que manufacturan los reactivos utilizados, así como los aparatos mencionados, ver Anexo 1.]

Tabla 8. Optimización de los parámetros de la PCR

Reactivos	Concentración/ cantidad <i>stock</i>	Concentración/cantidad final
<i>ADN genómico</i>	5 ng/ μ l	20 ng/ μ l, 25 ng/ μ l, 30 ng/ μ l, 35 ng/ μ l, 40 ng/ μ l
<i>Iniciadores</i>	2 μ M	0.3 μ M, 0.4 μ M
<i>Polimerasa Taq del ADN</i>	5U/ μ l	0.6 U, 1 U, 1.5 U
<i>Solución amortiguadora para Taq</i>	10x	1x
<i>Cloruro de magnesio</i>	50 mM	2.5 mM, 4.5mM, 5 mM, 5.5 mM
<i>Glicerol</i>	100%	10%
<i>Desoxioligonucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)</i>	10 mM*	50 μ M, 100 μ M, 200 μ M*

* Concentraciones correspondientes a cada uno de los dNTPs.

Inicialmente, se utilizaron muestras de ADN genómico correspondientes a las líneas de maíz B73, Mo17, y CML247 en las numerosas evaluaciones para el establecimiento de las cantidades y concentraciones de cada reactivo a fin de estandarizar la técnica.

Distintos volúmenes de reacción se probaron para obtener cantidades totales de 15 μ l, 20 μ l, 25 μ l. Todas las reacciones fueron preparadas bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar.

Los estudios de polimorfismo en secuencias microsatélites en un panel de progenitores y en poblaciones en segregación [ver abajo] se hicieron con reacciones de 20 μ l: 5 μ l ([25 ng final]) de ADN genómico; 3 μ l ([0.3 μ M final]) de cada iniciador; 0.2 μ l ([1U final]) de la polimerasa *Taq* del ADN; 1.6 μ l ([0.2 mM final]) de cada uno de los cuatro desoxioligonucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP); 1.5 μ l (1x final) de solución amortiguadora para la enzima polimerasa *Taq* del ADN; 0.75 μ l ([2.5 mM final]) de cloruro de magnesio; 1.5 μ l (10% final) de glicerol; 1.53 μ l de agua bidestilada; y 15 μ l de aceite mineral para cubrir cada muestra de reacción.

En la exploración de polimorfismo en secuencias microsatélite en maíz tropical y subtropical se evaluó la separación y diferenciación de bandas correspondientes a la mezcla de distintos productos de reacción (*bulking*) en un solo pozo [ver abajo]. Las reacciones de 30 μ l comprendieron: 5 μ l ([25 ng final]) de ADN genómico; 4.5 μ l ([0.3 μ M final]) de cada iniciador; 0.2 μ l ([1U final]) de polimerasa *Taq* del ADN; 2.4 μ l ([0.2 mM final]) de cada uno de los cuatro desoxioligonucleótidos; 3 μ l (1x final) de solución amortiguadora para la polimerasa *Taq* del ADN; 1.5 μ l ([2.5 mM final]) de cloruro de magnesio; 3 μ l (10% final) de glicerol; 5.9 μ l de agua bidestilada; y 25 μ l de aceite mineral para cubrir cada muestra de reacción.

1.1.2 Temperaturas de ensamblaje

Inicialmente, los diseños de programas para la amplificación por PCR contemplaron varias temperaturas de ensamblaje: 55°C, 59°C, 60°C, 62°C, 65°C (Tabla 9). Se utilizaron dos termocicladores tipo ERICOMP[®]TwinBlock[®]System Easycycler[®]Series, para todas las PCR.

Los resultados de amplificación determinaron usar los programas SSR60 y SSR62, cuyas temperaturas de ensamblaje concordaron con aquellos intervalos térmicos publicados. Las temperaturas de ensamblaje para el resto de los pares de iniciadores se infirió de la longitud similar que guardaban entre sí todos los iniciadores.

Tabla 9. Diseño de programas para la PCR en termociclador ERICOMP[®]

PROGRAMAS	CICLOS	TIEMPO (min)	TEMPERATURA (°C)
SSR 55	1	2	93
		1	93
	30	2	55 [▲]
		2	72
	1	5	72
1	*	15	
SSR 59	1	2	93
		1	93
	30	2	59 [▲]
		2	72
	1	5	72
1	*	15	
SSR 60	1	2	93
		1	93
	30	2	60 [▲]
		2	72
	1	5	72
1	*	15	
SSR 62	1	2	93
		1	93
	30	2	62 [▲]
		2	72
	1	5	72
1	*	15	
SSR 65	1	2	93
		1	93
	30	2	65 [▲]
		2	72
	1	5	72
1	*	15	

[▲]Temperatura de ensamblaje.

* Tiempo indefinido, pero menor a 24 h.

1.1.3 Electroforesis y detección

La electroforesis de los productos de reacción (10-12 μ l de volumen de muestra + 3 μ l de 5XSGB) y de un marcador referencial estándar (9-12 μ l de ϕ X174/*Hae*III+ 3 μ l de 5XSGB²⁹) se efectuó en geles de agarosa al 3% (Sambrook *et al.* 1989; Voet y Voet 1990; Hoisington *et al.* 1994) utilizando una proporción 1:1 de agarosas de alta pureza METAPHOR y SEAKEM LE (o NUSIEVE). Los geles se usaron tres veces mediante el procedimiento siguiente: cinco lavados con agua destilada (10 minutos cada uno); disolución por calentamiento; y, ajuste del peso con agua destilada hasta igualar al original.

Los geles de agarosa tuvieron un tamaño aproximado de 25x20 cm (largo x ancho) y espesor de 1 cm. Las condiciones de electroforesis fueron: 100-150 mA (90-120 V) iniciales y 100-200 mA (100-120 V) finales. Los geles se corrieron en 270 ml de solución amortiguadora 1X TBE³⁰ (Saghai-Marroof *et al.* 1984; Hoisington *et al.* 1994), por un período de 4-6 horas.

Con objeto de mejorar la resolución de las bandas de los productos de reacción (10.0 μ l de volumen de muestra + 3 μ l de 5XSGB) y de un marcador de referencia estándar (9.0-12 μ l de ϕ X174/*Hae*III + 3 μ l de 5XSGB), se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%. La proporción de acrilamida y *Bis*-acrilamida fue de 19:1 ó 29:1, usando como catalizadores de la polimerización al persulfato de amonio al 25% (p/v) y 65 μ l de TEMED (*N,N,N',N'*-Tetrametiletilenediamina) (Sambrook *et al.* 1989; Voet y Voet 1990).

Los geles de poliacrilamida tuvieron un tamaño aproximado de 22x20 cm (largo x ancho) y espesor de 0.75 cm. Las condiciones fueron: 30-75 mA (60-100 V) iniciales; 50 ó 60-120 mA (120-150 V) finales; por un período de 4-7 horas.

La concentración apropiada de los geles de agarosa y poliacrilamida para separar los productos de la PCR se seleccionó conforme a la Tabla 10.

Tabla 10. Selección de la concentración en dos sistemas de geles (agarosa y poliacrilamida) para la separación de productos de PCR

Tamaño de los fragmentos (pb)	Concentración de agarosa* % (p/v) (formato horizontal)	Concentración de poliacrilamida* % (p/v) (formato vertical)
500-1000	1.8	3.5
150-700	2.0	4.0
100-450	3.0	6.0
70-300	4.0	8.0
40-130	5.0	10.0

*Con amortiguador 1X TBE (Tris base 89 mM; Ácido Bórico 89 mM; EDTA 2 mM), pH 8.3.

Los geles, ya fuesen de agarosa o poliacrilamida, se sometieron a tinción con una solución de bromuro de etidio (1 μ g/ml) durante 10-30 minutos, y a uno o dos lavados con agua destilada (de 10 minutos cada uno). Los fragmentos de ADN se visualizaron con luz ultravioleta sobre un transiluminador de luz UV, y se fotografiaron sobre película fotográfica Polaroid[®] 667, con una abertura del diafragma de 4.5-5.6, y un tiempo de exposición de 1.0-1.5 segundos (Sambrook *et al.* 1989; Hoisington *et al.* 1994). [Nota: para información y detalles referentes a las compañías comerciales que manufacturan los reactivos utilizados, así como los aparatos mencionados, ver Anexo 1.]

²⁹ En inglés, *Sample Gel Buffer*: Tris 50mM pH 8.0; EDTA 5 mM pH 8.0; Sacarosa al 25%; 2 mg/ml de sal sódica de azul de bromofenol; 2 mg/ml de xilencianol (opcional); y agua destilada (c.b.p. 50 ó 100 ml).

³⁰ 5X TBE: Tris-Borato 0.45 mM; y EDTA 10 mM.

2- ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS EN SECUENCIAS MICROSATÉLITES

2.1 Cartografía

Al establecer las condiciones óptimas de la PCR, se utilizaron algunos iniciadores microsatélite elegidos de la totalidad del conjunto (Tabla 11), los cuales fueron: *gpc1(nc005)*, *mz-pdk1(nc012)*, *mz-glb1*, *mz-tpi4(nc030)*, *mz-adh2n(nc005)*, *mz-gpa1*, *phi001*, *phi008*, *phi022*, *phi034*, *phi064*, *phi065*, *phi085*, *phi096*. Se supuso que eran representativos de los demás iniciadores, puesto que poseían longitud similar (~20 nucleótidos) y compartían intervalos de temperatura para los diferentes ciclos.

Para la detección de polimorfismos en secuencias microsatélites en el panel de progenitores, se utilizaron pares de iniciadores cuyas secuencias fueron recientemente descubiertas y publicadas (Senior y Heun 1993; Senior y Chin 1995; Taramino y Tingey 1996; MaizeDB³¹ y GenBank³²). Las designaciones de los iniciadores microsatélites, son: *nc007*, *nc009*, *phi001*, *phi006*, *phi008*, *phi014*, *phi015*, *phi016*, *phi017*, *phi022*, *phi031*, *phi034*, *phi056*, *phi057*, *phi059*, *phi062*, *phi063*, *phi064*, *phi065*, *phi070*, *phi071*, *phi072*, *phi073*, *phi074*, *phi075*, *phi077*, *phi082*, *phi083*, *phi084*, *phi085*, *phi092*, *phi095*, *phi096*, *phi113*, *phi114*, *phi115*, *mz-glb1*, *mz-gpa1*, *gpc1(nc005)*, *mz-pdk1(nc012)*, *mz-tpi4(nc030)* y *mz-adh2n(nc004)*.

Las secuencias, tipo de repetición, *locus* – correspondiente a la designación de los sitios en el genoma que se identifica –, *bin* – localización aproximada del marcador en una región del cromosoma de maíz –, y características (longitud, peso molecular, temperatura teórica óptima de ensamblaje, longitud hipotética del producto de reacción) de cada uno de los iniciadores se enlistan igualmente en la Tabla 11.

La herencia de los polimorfismos en las secuencias microsatélites de las poblaciones en segregación se analizó con un grupo específico de marcadores para cada una. La selección de los iniciadores se decidió en función del polimorfismo que revelaron en el estudio sobre el panel de progenitores.

2.2 Diversidad genética del maíz tropical y el teocintle

En el examen inicial del estudio de variación genética en distintas accesiones de maíz tropical y subtropical se utilizó un conjunto de secuencias microsatélite que fuesen representativos (Bird *et al.* 1997; Robert McK.Bird, comunicación personal). Éstas son: *phi001*, *phi015*, *phi022*, *phi031*, *phi034*, *phi064*, *phi065*, *phi072*, *phi077*, *phi083*, *phi085*, *phi114*, *gpc1* y *mz-adh2n*. Las condiciones de reacción se siguieron como aquellas establecidas para el estudio cartográfico poblacional.

³¹ MaizeDB: <http://www.agron.missouri.edu/query.html>

³² GenBank: http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/query_form.html

Tabla 11. Relación general de los iniciadores microsatélites utilizados en los estudios de polimorfismo genético

DESIGNACIÓN DEL PAR DE INICIADORES SSR	REPETICIÓN SSR ¹	ADELANTE (FORWARD) (5'-3')	SECUENCIAS DEL INICIADOR	REVERSA (REVERSE) (5'-3')	LOCUS ²	BIN ³	LONGITUD DEL INICIADOR ⁴ (pb)	PESO MOLECULAR (g/mol)	TEMPERATURA TEÓRICA ÓPTIMA DE ENSAMBLAJE ⁵ (°C)	LONGITUD DEL PRODUCTO DE REACCIÓN ⁶ (pb) (GENBANK)	CÓDIGO DE ACCESO AL GENBANK ⁷
phi058	(GCG)5	AGCCGCAATCTGCTTCCTTC	ATGGCGAGGCGAGTGGTT	ATGGCGAGGCGAGTGGTT	lub1	1.01	22, 20	6854, 6512	58-68	87	X52878
phi059	(AGAGAA)5(Ag)7	CGATGCGCTTATCACTATTAGC	ATGCACATTTCTAGCACTATAGCAACT	ATGCACATTTCTAGCACTATAGCAACT	p1	1.03	25, 29	8007, 9266	58-68	169	Z11879
phi001	(GA)5	TPAGGACATGGATCGCTTCAC	ATGCAAGCGATGATCGCAAGC	ATGCAAGCGATGATCGCAAGC	fs2	1.03	22, 22	7108, 7176	58-66	142	L20621
mz-gb1	(TGC)5	AGAACCCGAAATCTTC	CAACGCAATCGAATGAG	CAACGCAATCGAATGAG	gfb1	1.09	18, 18	5492, 5532	56-60.8	(140,147)	X59084
phi064	(ATCC)3	CGAATTAATAGCTGAGAGCCT	CAATGACAGGAGTATATACAGAGC	CAATGACAGGAGTATATACAGAGC	csu03(gfu)	1.11	26, 26	8413, 8413	58-66	99	T12711
phi069	(TAGC)4	CAAAATACAGCAAGCAAGAC	ATTCATGCAAGCTGACAGCTACT	ATTCATGCAAGCTGACAGCTACT	prp3	2.04	24, 25	7749, 7985	58-66	132	T14732
ne030/mz-tp4	(CCGT)3(C)7	CCCTGTCTCTCTCTCTCC	CGAATTAATGGGGTGGG	CGAATTAATGGGGTGGG	lp4	3.04	20, 18	5878, 5594	54-59	115 (110)	L29431
phi073	(AGC)7	TTACTGCTATCCACTGCGCTGGAC	GGGCACTCCCTACAGCTCAAA	GGGCACTCCCTACAGCTCAAA	gsl4	3.05	26, 23	8283, 7384	58-66	99	X06755
phi072	(AAAC)3	ACCCTGCAATTAATTTCTCCAGCCTT	GCACAGCGCAAAATGGATTGAAT	GCACAGCGCAAAATGGATTGAAT	m11	4.01	28, 24	8949, 7802	58-66	143	S57628
ne-004/mz-ath2 ^A	(Ag)8	GTGAGAGAGAGCAGTAGC	CTTATCACCTTCTCTTC	CTTATCACCTTCTCTTC	adh2	4.03	18, 18	5581, 5360	54-57	109-127	X02915
phi074	(CAA)5	CCCAATTCGAACAACAACTCCCTTCA	GTGGCTCAAGTATGGCAAGAACT	GTGGCTCAAGTATGGCAAGAACT	zfp22.1	4.04	26, 23	8293, 7503	58-66	92	JO1245
ne-005/mpe1	(CT)19	CCTCTACTGCGAGTCGC	TTTATGATGATTTGAGCAG	TTTATGATGATTTGAGCAG	gpc1	4.05	18, 20	5355, 6144	58-63.3	148 (146)	X15596
phi098	(AGT)9/4	CAACAATGTCGTCTGCTCTATC	GTGACGCTGTGAATCTGTGCTTT	GTGACGCTGTGAATCTGTGCTTT	zpl19/22 (pms2)	4.05	24, 24	7655, 7775	58-66	102	X58700
phi092	(CAAG)4	ATGGAGAGCCTACTACAGG	GTGGAGAGCCTACTACAGG	GTGGAGAGCCTACTACAGG	ssu1	4.08	20, 20	8546, 8450	58-66	106	Y00322
phi008	(CCTT)3(CCC)3	AGGCGCATGCTGAACAGCT	CGCTTCACTCCCGTGAACAG	CGCTTCACTCCCGTGAACAG	cal3	4.11	20, 22	8466, 7003	58-66	87	L05934
ne-007	(TCC)7	ACTTTCCACCAACCAAGC	CTCGATGGAGAGAGCGG	CTCGATGGAGAGAGCGG	ohp2	5.00	20, 18	6938, 5893	58-66	149	L06478
phi113	(GTCT)3	GTCTCAGGTGGAGATGTA	CACACACATCCAGTACCAGAT	CACACACATCCAGTACCAGAT	o1e2	5.02	20, 24	6521, 7891	58-66	122	J05212
phi108	(GAT)6	GGATAGGAGAGCGATG	GAATGGCCAGCAGTCAATC	GAATGGCCAGCAGTCAATC	gbl15	5.03	17, 20	5564, 6410	58-66	102	X12564
phi085	(GCT)3	CGAGTCCAGCATCTGGAG	TTTGGATGCTGCTGGAGAC	TTTGGATGCTGCTGGAGAC	g1b4	5.07	22, 21	7070, 6753	58-66	90	D14577
phi075	(TC)7 (GC)3	GGAGAGCTCACCGCCATAA	AAAGGTTACTGGCAAAATATGGTAACCTCAACA	AAAGGTTACTGGCAAAATATGGTAACCTCAACA	lfx1	6.00	22, 38	7151, 12372	58-66	215, 228	M73830
phi077	(AG)12 (CAC)3	GGAGAGAGATCAGTTGTTCCGA	CGGTTAGATGCTGCTGCTTT	CGGTTAGATGCTGCTGCTTT	csu94(gfu)	6.01	24, 23	7833, 7347	58-66	148	T12715
phi031	(TAA)7	GCAGAGTACCTAGCTTCCGA	TCAGAGTACCTAGCTTCCGA	TCAGAGTACCTAGCTTCCGA	p11	6.04	24, 22	7602, 7074	58-66	186	L13454
ne-009	(TAA)29	CGAAGTGTATGATGAGAGACC	CGCTCTGACCGCTCTCTCT	CGCTCTGACCGCTCTCTCT	p11	6.04	20, 20	6483, 6189	58-66	144	L119496
ne-012/mz-pdk1	(CT)9	TAATTTAAACCCAGCACCGG	ACACAGCGCAAAAGAAAAC	ACACAGCGCAAAAGAAAAC	pdk1	6.05	22, 20	6595, 6047	58-65	107	M58656
phi070	(GAG)7/3	GTGAGGATCATAGTTTCAATCCAG	CCATGGAGGATCTCTCAAG	CCATGGAGGATCTCTCAAG	lfx1	6.07	22, 20	7092, 6441	58-65	81	D28552
phi057	(GCG)4	CTCATCAGTGGCTGCTCAT	CAATGAGAGCAACCGTGGC	CAATGAGAGCAACCGTGGC	o2	7.01	21, 21	6673, 6740	58-66	154	X15544
phi034	(CCT)4	TAGCGACAGATGGCTCTTCT	GGGGAGCACGCTCTCTCTCT	GGGGAGCACGCTCTCTCTCT	cyp-uaz338(gfu)	7.02	22, 20	7083, 6448	58-66	123	T15323
phi114	(CG)3 (TGC)4 (TAA)4	CCGAGACGATCAAGCCATCAA	AGCTCCAAAGATTTCTGAACTGAG	AGCTCCAAAGATTTCTGAACTGAG	oec17*-Zz6824	7.02	22, 24	7039, 7673	58-66	160	Z28824
phi082	(GA)12 (CAC)4 (TAA) (ATAC)3	CACAGCACAGGAGTTG	CGCGCAAAAAGATCTTGAACACCT	CGCGCAAAAAGATCTTGAACACCT	uaz230(gfu)	7.06	18, 24	5783, 7722	58-66	133	T14679
phi115	(GAA)4 (GAA)4 (GG)7	CTAGTGGGCAACAACATGGTAAAG	AAAGAGACGATGTCAGATTGGCC	AAAGAGACGATGTCAGATTGGCC	act1-W64	8.04	23, 23	7512, 7472	58-66	104	JO1238
phi014	(TTTCCG)2 (GTT)6 (TAC)3 (GC)3	AGATGACAGAGCGCTCAAGAG	CGAGTTCACAGCTTCTCTCTG	CGAGTTCACAGCTTCTCTCTG	rip1	8.04	23, 26	7442, 8274	58-66	165	M83927
phi017	(TTTCCG)2 (GTT)6 (TAC)3 (GC)3	CGAAGTACCTAGCTTCCGA	AGCTGCTATTGAAATACCGAGAG	AGCTGCTATTGAAATACCGAGAG	gnt1	8.08	22, 24	7012, 7753	58-66	97	M18900
phi022	(GAT)3 (GCT)3 (GACT)2 (CACT)3	CTTGGCAGCCAGATGCTGAT	TCACAGACCTTGCATCAAC	TCACAGACCTTGCATCAAC	bz1	9.02	25, 26	8178, 7987	58-66	103	X07937
phi065	(GAT)3 (GCT)3 (GACT)2 (CACT)3	CGGAGCGAGCTTCCAAAC	TCGACAGCGAGCTAGCC	TCGACAGCGAGCTAGCC	wz1	9.03	20, 20	6065, 6105	58-66	136	M24258
phi016	(GAT)3 (GCT)3 (GACT)2 (CACT)3	AGGAGCAAAATACGTTGAGACAG	CGATCTGCAAAAGTGGAGTGTG	CGATCTGCAAAAGTGGAGTGTG	ppp1	9.03	24, 25	7660, 7793	58-66	171	X12339
phi063	(TCTA)7 (GAG)5 (CAC)2	GGCGGCGTCTGTTGTA	CAGTACGCGCTAGATATAGCT	CAGTACGCGCTAGATATAGCT	csu51	9.04	24, 24	7396, 7740	58-66	150	L29418
mz-gpa1	(TCT)10	GTACACGATGGCACTCC	uaz5505612	uaz5505612	csu51	10.02	18, 24	5595, 7383	58-66	170	T12681
phi071	(AGG)4 (AG)4	GGATTTGATCAGTACGCCATCT	GGTACAGCTGGCAAGC	GGTACAGCTGGCAAGC	gpa1	10.04	24, 21	7713, 6408	58-66	147	T15295
phi062	(GAG)5 (GAA)3	CCACCCGCTAGCTACTGAA	TTTCTGTTGATCTGACCCAGC	TTTCTGTTGATCTGACCCAGC	hsp90*	10.04	23, 24	7334, 7637	58-66	108 (100)	X15408
phi084	(GAG)5 (GAA)3	AGAGAAATCCGATCCATCCAGC	CACCCGCTACTGAGTAACTTC	CACCCGCTACTGAGTAACTTC	mgs1	10.04	22, 23	6981, 7356	58-66	160	S44171
					nac1	10.04	22, 23	7731, 7030	58-66	159	T14760

NOTAS: ¹ Tipo de repetición núcleo de secuencia. ² Designación(es) para un locus (o varios loci) que corresponden(es) directamente a la(s) designación(es) de la(s) posición(es) en los mapas públicos. ³ Localización aproximada del marcador en una región del cromosoma. ⁴ Longitud del iniciador (oligonucleótido) establecida en GenBank. ⁵ Temperatura teórica para la fase de ensamblaje del ciclo de PCR, cada par de iniciadores es específico para la secuencia de una determinada región flanco del SSR designado. ⁶ Longitud estimada (GenBank) del producto amplificado a partir de un alelo. ⁷ Código con el que se accede a la información del iniciador en GenBank (vigente hasta marzo de 1997). Información de: Senor y Heun 1993; Senor et al 1995, 1996; A Robert McK Bird (comunicación personal).

3 - CARTOGRAFÍA

3.1 Establecimiento del polimorfismo microsatélite

Las líneas y poblaciones de maíz tropical (*Zea mays*, L.) utilizadas para el análisis de los polimorfismos en secuencias microsatélites han sido empleados en otros proyectos de investigación en el Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT (Tablas 12 y 13). Incluyen progenitores de variedades de los estudios de resistencia a los insectos SWCB³³ y SCB³⁴: CML131xCML67 (Groh *et al.*, en prensa) y Ki3xCML139 (Khairallah *et al.*, en prensa); en selección facilitada por marcadores³⁵ para resistencia a los insectos SWCB y SCB: CML67xCML204 (Hoisington *et al.* 1996); intervalo anthesis-floreCIMIENTO masculino (estigma)³⁶: Ac7643_{S5}xAc7729/TZRW_{S5} (Ribaut *et al.* 1996); en selección facilitada por marcadores³⁷ para ASI: Ac7643_{S5}x CML247 (Jean-Marcel Ribaut, comunicación personal); y, en resistencia a la pudrición de mazorca causada por *Fusarium moniliforme* (Programa de Maíz del CIMMYT). En adición, se eligieron variedades élite de maíz clásicos de zona templada como testigos (B73 y Mo17) (Beavis y Grant 1991; Senior *et al.* 1995).

Aquellos progenitores entre los que se distinguiesen polimorfismos genéticos con diversos iniciadores microsatélite serían seleccionados para, posteriormente, evaluar la herencia de tales polimorfismos en secuencias microsatélites sobre las correspondientes poblaciones en segregación.

Las muestras de ADN de los progenitores y de los sujetos de experimentación de las poblaciones segregantes de maíz se encontraban previamente extraídas (Hoisington *et al.* 1994), seleccionándose al azar veintiséis individuos como muestra de cada población, es decir entre el 5 y 14% (Tabla 13).

3.2 Estudio del polimorfismo de las poblaciones en segregación

Previo al análisis de polimorfismo de secuencias microsatélites, se verificó la calidad de las muestras del ADN de los materiales vegetales a emplear. Sólo una de todas las muestras poblacionales (CML67xCML204) se encontraba con un severo índice de degradación del material genético, lo que la hacía inservible para cualquier análisis.

Las cruza de progenitores que presentaron el mayor polimorfismo genético y de cuyas poblaciones generadas se poseía un mapa de ligamiento genético, fueron: Ac7643_{S5} x Ac7729/TZRW_{S5} (P42xP48), Ac7643_{S5}x CML247 (P42xCML247), Ki3xCML139, y CML131xCML67.

³³ En inglés, *South Western Corn Borer*, barrenador grande del maíz (*Diatraea grandiosella*).

³⁴ En inglés, *Sugar Cane Borer*, barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*).

³⁵ En inglés, MAS: *Marker Assisted Selection*.

³⁶ En inglés, ASI: *Anthesis-Silking Interval*.

³⁷ En inglés, MAS: *Marker Assisted Selection*.

Tabla 12. Resumen de características de los progenitores de maíz

Progenitores	Genealogía (<i>Pedigree</i>)	Descripción
Ki3	Ki3-7-b1-b1#b1	Tropical tardío, susceptible a SWCB ¹ y SCB ²
CML139	Mp78 518-15-b1-b1#b1	Intermedio subtropical, resistente a SWCB y SCB
CML131	P42c4F226-1#2-1-1#b1#b1-3-b1-b1#b1	Intermedio subtropical, muy susceptible a SWCB y SCB
CML67	[AntGp2-5#1/Ant38586-1]-6-b1-4-2-5-b1-b1#b1	Tropical tardío, muy resistente a SWCB y SCB
CML204	[7794]-SELF-4-1-S9-1-4-7-4-5-b-b	Tropical tardío, muy susceptible a SWCB
Ac7643 _{S5} (P42)	Tropical tardío, ASI ³ largo
Ac7729/TZRW _{S5} (P48)	Tropical tardío, ASI corto
CML247	(P24F119*P24F54)-6-4-1-1-BB-f	<i>Tester</i> ⁴ con gran capacidad combinatoria, altamente susceptible a sequía
3T	B.P.R.L. BA90 39-1-2-1-#2-3	Valles altos, resistente a <i>Fusarium moniliforme</i>
5T	((CH88R 296x1297) x (BA8785 MH10-1-1-4TL))-1-2-B-#1-2	<i>Idem</i>
18B	Pob. 800 C5 HC37-2-1-1-2-B	Valles altos, susceptible a <i>Fusarium moniliforme</i>
20B	Pob. 85 C4 HC 142-5-8-1-2-B	<i>Idem</i>
B73	B73-b1#b1	Cultivar del Corn Belt
Mo17	Mo17	Cultivar del Corn Belt

¹ SWCB: *South Western Corn Borer*, Barrenador grande del maíz (*Diatraea grandiosella*).

² SCB: *Sugar Cane Borer*, Barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*).

³ ASI: *Anthesis Silking Interval*, Intervalo anthesis-floreCIMIENTO masculino (estigma).

⁴ Cultivar "probador" o control.

Tabla 13. Relación del material vegetal utilizado en estudios de polimorfismo en secuencias microsatélite entre cruzaS seleccionadas

Cruzas	Tipo de Población	Tamaño de Población	Individuos empleados en los estudios		
			RFLP	SSR	%
Ac7643 _{S5} x Ac7729/TZRW _{S5}	F ₂	234	234	26	11
Ac7643 _{S5} x CML247	F ₂	~200	~200	26	~13
Ki3xCML139	F ₂	475	475	26	5
CML131xCML67	F ₇ , RIL	190	190	26	~14
CML67xCML204	BC ₁ F ₁	200	200	—	—

Con objeto de evaluar la herencia de los polimorfismos en secuencias microsatélite sobre las correspondientes poblaciones en segregación, se seleccionó un grupo de iniciadores microsatélites (específicos para cada una) para la amplificación vía PCR. Tal selección fue conducida en función de los resultados obtenidos en la criba de polimorfismo de secuencias en microsatélites en el panel de progenitores.

3.3 Construcción de los mapas de ligamiento genético

Los resultados obtenidos de la segregación de los polimorfismos en secuencias microsatélites en las muestras poblacionales, visualizados en las placas fotográficas, fueron introducidos en el programa denominado "Hypercard Map Data" versión 1.5 (Hoisington y González-de-León 1993), a los diferentes archivos de información genotípica de cada cruce y población de estudio ya existentes. Se les transfirió al programa "MapMaker" versión 2.0 (Lander *et al.* 1987), para incorporarles en los mapas de ligamiento correspondientes. Los mapas utilizados fueron:

- P42xP48 (Ribaut *et al.* 1996)
- P42xCML247 (Jean-Marcel Ribaut, comunicación personal)
- Ki3xCML139 (<http://192.100.189.39/cimmyt/biotechnology/LinkageMaps/www.html>)
- CML131xCML67 (<http://192.100.189.39/cimmyt/biotechnology/LinkageMaps/www.html>)

La construcción de los grupos de ligamiento requirió el análisis cartográfico multipuntual con valores $LOD \geq 3.0$ y θ (*theta*) ≤ 0.4 , haciendo uso de la función de recombinación de Haldane (Haldane 1919; Haldane y Waddington 1931).

El orden de los marcadores moleculares se examinó ensayando todas las probabilidades de mapas. Esto confirmó el mejor orden posible, de manera que se incrementara aritméticamente en proporción al aumento del número de *loci*.

Una vez establecido el orden más razonable de los grupos de ligamiento, se comparó la consistencia de tal orden ensayando todas las posibles alternativas de mapas mediante otro algoritmo. Todo lo anterior se llevó a término en un ordenador Macintosh[®] modelo IICI, con la versión pertinente del programa (Scott Tingey, comunicación personal).

Los comandos utilizados en el programa MapMaker fueron:

- i. **ORDER.** Construye órdenes de mapa automáticamente. Realiza lo siguiente:
 1. Trata de encontrar un subgrupo de *loci*, para el cual se identifica un solo orden con mayor probabilidad que cualquier otro mediante un análisis donde se ensayan todas las probabilidades de órdenes posibles.
 2. Añade los marcadores restantes, uno a la vez, que pueden ser ubicados en el mapa a una posición única.
 3. Finalmente, cualesquier marcadores que no se ubicaron a una posición única en el orden, se integran en intervalos múltiples.
- ii. **SEQUENCE.** Selecciona los *loci* y órdenes a analizar.
- iii. **GROUP.** Separa a los marcadores (enlistados en la secuencia) en diferentes grupos de ligamiento. Calcula la distancia de máxima probabilidad y "*LOD score*" correspondiente entre dos marcadores. Se consideran ligados todos los pares de *loci* que posean una distancia menor o igual al valor máximo específico y un "*LOD score*" que exceda un valor mínimo específico.
- iv. **MAP.** Calcula y muestra el mapa de máxima probabilidad de el(los) orden(es) de marcadores, especificado(s) por la secuencia establecida. Se muestran los nombres de los *loci*, así como las distancias en cM (Haldane) o la fracción de recombinación.
- v. **ASSIGN.** Coloca uno o más marcadores en grupos preasignados a determinados cromosomas mediante ligamiento.
- vi. **LIST CHROMOSOMES.** Muestra la relación (en resumen) del número total de marcadores asignado a cada cromosoma (de existir marcadores relacionados a los cromosomas).
- vii. **SEQUENCE.** Selecciona los *loci* y órdenes a analizar.

- viii. *LIST STATUS*. Muestra una relación diferente (en resumen) del número total de marcadores asignados (o no) a cromosoma alguno en el mapa.
- ix. *LINK*. Genera una lista de todos los marcadores en una secuencia establecida que se supone se encuentran ligados a:
 - a) cualesquier marcadores en el conjunto de datos (sea en ningún o en cualquier cromosoma), o
 - b) cualesquier marcadores asignados al cromosoma especificado.
- x. *PLACE/TRY*. Inserta un(os) marcador(es) sin asignar en un orden conocido de los *loci* a los cuales se supone/conoce se encuentra(n) ligado(s). Calcula los mapas de máxima probabilidad para la secuencia establecida con el(los) nuevo(s) marcador(es) inserto(s) en cada intervalo.
- xi. *RIPPLE*. Evalúa un orden de mapa comparando todas las probabilidades del orden del mapa original cuando se permuta el orden de los *loci* adyacentes.

4- ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL MAÍZ TROPICAL Y SUBTROPICAL

4.1 Material vegetal

El análisis del polimorfismo con secuencias microsatélites en maíz tropical y subtropical requirió de varios individuos pertenecientes a diferentes accesiones de la razas Tuxpeño (*Zea mays*, L.) y dos Teocintles (*Zea luxurians*, L.); y de las variedades de maíz B73, Mo17 y CML247 como testigos (Tabla 14). Tales accesiones —relacionadas filogenéticamente por pertenecer al complejo racial Tuxpeño— se seleccionaron a partir de un subconjunto de 80, y representan a once distintos conglomerados definidos en un análisis de 175 miembros efectuado por Taba *et al.* (1994).

Al pretender analizar la diversidad intraaccesión, se utilizaron seis muestras diferentes de ADN correspondientes a la accesión Veracruz141. Se efectuaron los experimentos con marcadores microsatélites con cada una de ellas como si fuesen una más de las entidades de estudio; la identificación fue sencilla: 1, 2, 3, ..., 6 (Tabla 14).

Se incluyeron B73 y Mo17 por ser cultivares endogámicos del denominado grupo racial "Corn Belt" —"Faja Maicera", *verbigratia*—, de filogenia no directa con el grupo tropical ni con el subtropical. Igualmente, la línea endogámica CML247 fue una suerte de control por no estar relacionada genéticamente con la totalidad de las accesiones.

El estudio de diversidad genética comprendió dos muestras de Teocintle. Siendo maíz subtropical, se supuso la separación del conjunto total de maíz tropical. Debido al formato experimental (de los geles de poliacrilamida), se hubo de incluir una misma muestra de la accesión *Zea luxurians* Nicaragua en los dos geles; se les denominó "NicaA" y "NicaB" por facilidad de manejo. Funcionaron como referencia al comparar calidad de banda, migración y número de alelos amplificados entre ambas muestras.

El método establecido para la extracción por fenol-cloroformo (Hoisington *et al.* 1994) se siguió para 71 muestras de ADN de individuos del complejo racial Tuxpeño (de las que se utilizaron 17) y de *Zea luxurians* (una muestra tanto de la raza Nicaragua como de la raza Guatemala).

4.2 Mezcla (*bulking*) de muestras

Se condujo un experimento para analizar la separación y diferenciación de bandas de amplificación correspondientes a la mezcla de diferentes muestras de ADN vegetal en un solo pozo o carril del gel (*sample bulking*). Esto, con objeto de disminuir el número de muestras utilizadas en los geles sin perder información de la frecuencia alélica. Los tres grupos conformados por muestras de la accesión Veracruz141 fueron: α (individuos 1, 2 y 3), β (individuos 4, 5 y 6) y χ (individuos 1-6). A éste último, siendo el conjunto total de muestras de la accesión, se le denominó "Veracruz141B" para efectos del análisis conjuntamente con las demás accesiones (Tabla 14).

Tabla 14. Maíces tropicales y teocintles (*Zea mays*, L. y *Zea luxurians*, L.) utilizados en el estudio de polimorfismo en secuencias microsatélites

Accesión*	Clasificación de Razas		Tipo de grano	Cluster ^a	Número de individuos (Identificación)
	Primaria	Secundaria			
Veracruz 141	Tuxpeño típico		Dentado	2	1 (# 286)
Veracruz 141B	Tuxpeño típico		Dentado	2	6 (# 1-6)
Nayarit 173	Tuxpeño	Vandeño	Dentado	3	1 (# 23)
Veracruz 193	Tepecintle	Tuxpeño	Dentado	4	1 (# 185)
Veracruz 207	Tepecintle	Tuxpeño	Dentado	4	1 (# 161)
Veracruz 158	Tuxpeño		Dentado	5	1 (# 44)
Veracruz 145	Tuxpeño típico		Dentado	6	1 (# 254)
Veracruz 223	Tuxpeño	Tepecintle	Dentado	6	1 (# 208)
Michoacán 182	Tuxpeño típico		Dentado	6	1 (# 231)
Sinaloa 95	Vandeño	Celaya	Dentado	9	1 (# 89)
Tamaulipas 125	Tuxpeño		Dentado	10	1 (# 113)
Nayarit 284	Tuxpeño	Vandeño	Dentado	11	1 (# 136)
<i>Zea luxurians</i> (Nicaragua)	Cristalino	1 (# 284)
<i>Zea luxurians</i> (Guatemala)	Guatemala	1 (# 281)
B73	<i>Reid Yellow Dent</i>		Dentado	1
Mo17	<i>Lancaster</i>		Dentado	1
	<i>SureCrop</i>				
CML247	Línea endogámica del CIMMYT		Semidentado	1

* El nombre designa la entidad federativa de México donde se efectuó la recolección; el número que le acompaña relaciona el número de muestra.

^a Clasificación numérica del estudio de conglomerados por Taba *et al.* (1994), al cual pertenece cada accesión.

Modificación a Taba *et al.* 1994, y Brown y Goodman 1977.

4.3 Lectura de bandas y coeficientes de similaridad

En primera instancia, se determinó el número de bandas (*i.e.*, alelos) que fueron verificados en los geles de poliacrilamida por cada par de iniciadores (*i.e.*, locus microsatélite) con las diferentes accesiones de Tuxpeños y de los testigos. La interpretación de los múltiples amplicones en cada experimento se efectuó disponiéndoles en diferentes "niveles" horizontales con respecto a su longitud y migración electroforética (teniendo como parámetro al marcador referencial estándar (ϕ X174/*Hae*III, GIBCO BRL).

Posteriormente, se categorizó cualitativamente a las numerosas bandas (por *nivel*) en función de la intensidad de amplificación de la misma; esto es, en cada uno de los *niveles* de bandas se denominó como "a" a las bandas (alelos) de mayor intensidad, "b" a las de mediano grado y "c" a aquellas de menor calidad de amplificación, por cada locus microsatélite. De tal suerte, se conformaron tres diferentes matrices: "abc", donde (en cada *nivel* de banda) se consideraron las tres intensidades de amplificación; "ab", en la que se sólo se consideraron las bandas de mayor y mediano grado; y, "a", constituida por sólo las bandas de mayor intensidad. De tal suerte, se consideró al conjunto de mediciones como datos crudos (*raw data*) en lenguaje binario para cada matriz generada: se tradujo la presencia como "1" (uno), la ausencia como "0" (cero) y los datos faltantes con el signo "." (punto). Los datos crudos, en total, conformaron tres matrices ($N \times p$) de mediciones (X) (Everitt 1980):

$$X = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1p} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2p} \\ \cdot & & & \\ x_{N1} & \cdots & x_{Np} \end{bmatrix}$$

donde,

- p es el registro de las mediciones;
- x_{ij} es el intervalo en la variable, carácter o atributo j ;
- I es el individuo, entidad u objeto bajo estudio;
- N es el conjunto de entidades con un número de clases en el que tales objetos compartieran similaridades.

Una vez establecidas las matrices binarias correspondientes, se transfirieron al programa computacional SYSTAT[®] (Wilkinson 1989), donde se realizaron los análisis estadísticos para el estudio de la diversidad. Para tal efecto, se calcularon coeficientes de similaridad³⁸, mismos que computaron los valores en un cociente de 0 a 1 —asociaciones de *ausencia* o *presencia*— o con un signo que denotase amplificación nula ("."), de acuerdo a la siguiente tabla:

		X_j	
		1	0
X_j	1	a	b
X_j	0	c	d
		(a+c)	(b+d)
		(a+b)	(c+d)

³⁸ Coeficiente que examina la relación entre dos individuos, en función de los valores de un conjunto de mediciones comunes a ambos (Everitt 1980).

Siendo la representación (en fórmulas) de los cálculos de los coeficientes de similitud utilizados como sigue (Everitt 1980; Wilkinson 1989):

$$s3 = \frac{a}{a + b + c}$$

$$s5 = \frac{a}{a + 2(b + c)}$$

- La elección de los mencionados coeficientes obedeció a que:
- $s3$ es una proporción de pares con ambos valores presentes, donde *ocurre* uno al menos (Coeficiente de Jaccard); no considera la ausencia simultánea de una banda.
- $s5$ es un $s3$ estandarizado por todos los patrones posibles generados por concordancia e inconsistencia (Coeficiente de Anderberg); otorga mayor importancia a las diferencias existentes entre las variables.

Los datos faltantes en las tres matrices se analizaron por separado con las funciones de supresión *listwise* y *pairwise*. La primera eliminó cualquier observación o valor faltante de las variables incluidas en la totalidad de la matriz. La última es una suerte de supresión *listwise* que analizó cualquier posible combinación en pares de variables.

4.4 Análisis de conglomerados

Una vez elaboradas las matrices binarias, se procedió a efectuar el análisis de conglomerados³⁹ (*cluster analysis*). El desarrollo de las clasificaciones jerárquicas consideró la métrica Euclideana, donde la distancia que media entre los puntos i y j , denotada por d_{ij} , se define como:

$$d_{ij} = \left\{ \sum_{k=1}^p (X_{ik} - X_{jk})^2 \right\}^{1/2}$$

donde,

X_{ik} es el valor de la variable k para la entidad i

Tales clasificaciones jerárquicas se representaron por estructuras de árbol invertidas o dendrogramas haciendo uso del método de promedio de grupo (*Group Average Method*), que definió la distancia entre los grupos como el promedio de las distancias entre todos los pares de objetos en los grupos totales (Everitt 1980; Wilkinson 1989) Se representa en la siguiente expresión (Krzanowski 1988):

³⁹ Grupo de elementos contiguos de una población estadística que, al compartir ciertas similitudes, definen su exclusión de otros —contemplados en grupos ajenos—. Tales entidades (dentro del grupo) pueden definirse como un agregado de puntos en el espacio de prueba tal, que la distancia entre cualesquier dos puntos en el grupo es menor a la *distancia* entre cualquier punto en el grupo y cualquier otro punto fuera de él (Everitt 1980).

$$D_{k,y} = \frac{n_i}{n_i + n_j} D_{ki} + \frac{n_j}{n_i + n_j} D_{kj}$$

donde,

n_i es el número de individuos que conforman los grupos de i ;

n_j es el número de individuos que conforman los grupos de j ;

D_{kij} es la distancia entre cualquier grupo k y la unión de los grupos i y j ; esto es, el promedio de las diferencias $n_i n_j$ entre cada uno de los elementos tanto de i como de j ;

D_{ij} es la distancia entre los grupos i y j ;

D_{kj} es la distancia entre los grupos k y j .

4.5 Análisis de componentes principales (ACP)

Los registros —léase, variables— se definieron en *verbal* (texto) y *cuantitativo* (numérico), y se analizaron a partir de las matrices de correlaciones de muestras. Se resumió el conjunto total de datos de las variables múltiples utilizando cuatro componentes, mismos que explicaban la varianza; iteraciones fueron 25, tolerancia 0.001 y valores propios (*eigenvalues*) equivalentes a cero.

Aquellos componentes o factores que explicaban el mayor porcentaje de la varianza se calcularon a partir de las matrices de covarianza de muestras.

Para el despliegado de los diagramas (representaciones gráficas en tres ejes de los datos) se ensayaron todas las posibilidades combinatorias de los factores definidos. Finalmente, sólo se consideraron aquellos factores —i.e., dimensiones— que *mejor* representaban a las entidades en el espacio p -dimensional: Factor 1 *versus* Factor 2, Factor 1 *versus* Factor 3, y Factor 2 *versus* Factor 3.

RESULTADOS

1- ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

1.1 Determinación de parámetros

1.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa

Las modificaciones en la determinación de las cantidades precisas de los reactivos, integradas con los parámetros experimentales, condujeron a la optimización de la reacción en cadena de la polimerasa, permitiendo obtener los mejores resultados de amplificación de secuencias con los pares de iniciadores utilizados. La concentración final de los reactivos se describe en la Tabla 15.

Tabla 15. Optimización de los parámetros de la PCR

Reactivos	Concentración/ cantidad final
<i>ADN genómico</i>	25 ng/ μ l
<i>Iniciadores</i>	0.3 μ M
<i>Polimerasa Taq del ADN</i>	1 U
<i>Solución amortiguadora para Taq</i>	1x
<i>Cloruro de magnesio</i>	2.5 mM
<i>Glicerol</i>	10%
<i>Desoxioligonucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)</i>	200 μ M*

* Concentraciones correspondientes a cada uno de los dNTPs.

Finalmente, el cálculo de las reacciones (20 μ l total) consistió en: 5 μ l ([25 ng final]) de ADN genómico; 3 μ l ([0.3 μ M final]) de cada iniciador; 0.2 μ l ([1U final]) de la enzima polimerasa *Taq* del ADN; 1.6 μ l ([0.2 mM final]) de cada uno de los cuatro desoxioligonucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP); 1.5 μ l (1x final) de solución amortiguadora para la enzima polimerasa *Taq* del ADN; 0.75 μ l ([2.5 mM final]) de cloruro de magnesio; 1.5 μ l (10% final) de glicerol; 1.53 μ l de agua bidestilada; y 15 μ l de aceite mineral para cubrir cada muestra de reacción.

1.1.2 Temperaturas de ensamblaje

La información publicada de los intervalos de las temperaturas de ensamblaje para cada uno de los iniciadores fue congruente con lo observado en las evaluaciones con los cultivares testigo B73, Mo17 y CML247 (Tabla 16). Las diferentes temperaturas en los programas elegidos para las PCR fueron: 59°C, 60°C (modificación a SSR 59 para mejorar la calidad de los amplicones) y 62°C.

1.1.3 Electroforesis y detección

La selección de la concentración de los geles de agarosa y poliacrilamida (3% y 6%, respectivamente) fue adecuada para el tamaño de los productos de amplificación (~70 y 280 pb).

El uso de las agarosas de alta pureza, la solución amortiguadora y las condiciones bajo las cuales se llevaron a efecto las electroforesis, permitieron verificar una buena resolución de los productos de la PCR.

Los geles de agarosa de alta resolución al 3% permitieron distinguir fragmentos de ~200-2000 pb. En cambio, la electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% hizo posible la identificación de fragmentos de ca. 70 y 200 pb, siendo posible separar fragmentos de menor longitud.

Tabla 16. Resultados del estudio de temperatura óptima, calidad de banda y polimorfismo para B73, Mo17 y CML247

DESIGNACIÓN DEL PAR DE INICIADORES SSR	Calidad por Temperatura de Ensamblaje ¹					Polimorfismo ²	Bandas Múltiples	Longitud de los amplicones ³ (pb)
	55°C	59°C	60°C	62°C	65°C			
<i>nc005/GPC1</i>	débil	buena	buena	buena	buena	1	si	194-234
<i>nc012/MZ-PDK1</i>	débil	buena	buena	buena	débil	0	no	190-194
<i>MZ-GLB1</i>	muy débil	buena	buena	buena	débil	1	si	194, 215
<i>nc030/MZ-TPI4</i>	muy débil	débil	débil	débil	muy débil	1	no	180-194
<i>ADH2N</i>	muy débil	buena	buena	débil	ninguna	1	no	190-194
<i>MZ-GPA1</i>	débil	buena	buena	débil	débil	0	si	190, 194
<i>phi001</i>	ninguna	débil	muy débil	débil	indefinida	1	si	72, 170-190
<i>phi008</i>	ninguna	indefinida	muy débil	débil	indefinida	0	si	100-194
<i>phi022</i>	débil	buena	buena	buena	buena	1	no	130-150
<i>phi034</i>	débil	buena	buena	buena	buena	1	no	218-220
<i>phi064</i>	débil	buena	buena	buena	buena	1	no	80-110
<i>phi065</i>	débil	buena	buena	buena	buena	1	no	200-234
<i>phi085</i>	débil	buena	buena	buena	buena	1	no	160-180
<i>phi096</i>	débil	buena	buena	buena	buena?	1	no	80-92

NOTAS: ¹ Temperatura para el ciclo de ensamblaje en PCR; se resaltan (en negrillas) las evaluaciones de los resultados más satisfactorios. ² 1: Polimorfismo diferenciable; 0: nulo polimorfismo. ³ Estimaciones aproximadas sobre los resultados en geles de agarosa al 3%.

El utilizar hasta tres veces los geles de agarosa de alta pureza al 3% no impidió distinguir las bandas, aún cuando (con cada uso) se disminuyó paulatinamente la calidad de resolución de los fragmentos amplificados.

2- CARTOGRAFÍA

2.1 Establecimiento del polimorfismo microsatélite

En la criba de polimorfismo molecular con los progenitores analizados con cuarenta y dos pares de iniciadores microsatélites se observó variación en cuanto a polimorfismo, calidad e intensidad de banda, así como diversos niveles de amplificación de los amplicones (Tabla 17; Figs.12 y 13).

En general, existió un índice alto de amplificación de la secuencia microsatélite. Del total de los iniciadores, 38% presentaron buen polimorfismo; 14% diferenciación genética regular; y, deficiente un 33% y amplificación nula, 14%. Con respecto de la calidad de banda, en conjunto fue buena (9% excelente, 21% buena y 21% mediana). Hubo problemas de amplificación en el 36% de los experimentos con los iniciadores microsatélite; bandas múltiples un 60%; y, amplificación nula en un 5%.

Un 14% de los iniciadores requirió del ciclo con temperatura de ensamblaje 59-60°C, y un 86% aquel de temperatura de ensamblaje 62°C.

Sustentada la selección en criterios de calidad de banda (Tabla 17), en grado de polimorfismo microsatélite observado entre los progenitores, y en la preexistencia de mapas de ligamiento cromosómico, se decidió continuar la investigación con los progenitores Ki3, CML139, Ac7643_{SS} (P42), Ac7729/TZSRW_{SS} (P48), CML247, CML131, y CML67. Consecuentemente, las cruzas retenidas fueron: Ac7643_{SS} x Ac7729/TZSRW_{SS}, Ac7643_{SS} x CML247, Ki3xCML139 y CML131xCML67.

Se descartaron las cruzas 3Tx18B, 5Tx18B y 3Tx20B, puesto que se estaba generando la población en ese instante y se carecía de mapa de ligamiento genético.

2.2 Estudio de las poblaciones en segregación F_2 y RIL

La relación de las cruzas, los individuos seleccionados al azar y los iniciadores microsatélites –elegidos para cada una– usados en el estudio se refieren en la Tabla 18. Casualmente, se empleó repetidamente un conjunto de microsatélites en las diferentes poblaciones (Tabla 18). Sólo unos cuantos marcadores se utilizaron en una sola ocasión en una población en particular: *phi077* (P42xP48), *phi095* (CML131 x CML67), *phi072* (CML131 x CML67) y *mz-pdk1* (CML131 x CML67) (Tabla 18).

Muestras de un notable polimorfismo entre los progenitores y los individuos de las poblaciones seleccionados son las Figuras 14 a 17.

Tabla 17. Estudio de la calidad de banda y polimorfismo de iniciadores microsátélites con un panel seleccionado de progenitores de maíz (*Zea mays*, L.)

Designación del par de iniciadores SSR	PROGENITORES													Longitud de los amplicones ^a (pb) (F/R)	Temperatura experimental ^b (°C)	Calidad de amplificación
	K13	CML139	CML131	CML67	CML204	P42 ^a	P48 ^b	CML247	3T	5T	18B	20B				
nc030/MZ-TPI4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	180-194	59/60	mala	
nc012/MZ-PDK1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	190-194	59/60	mala	
nc004/MZ-ADH2N	2?	0	2	2	0	2	2	2	2	0	2	1	190-194	59/60	mala	
nc005/GPC1	1	3	2	0	2	1	0	2	3	2	2	0	194-234	59/60	regular	
MZ-GLB1	2	1?	1?	2	2	2	2	1	2	2	1	2	194-215	59/60	buena	
MZ-GPA1	1,2	2	2	2	2	2	2	0	0?	2?	2	2	194	59/60	mala	
phi056	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	82-90	62	mala	
phi095	0	2	2?	2	0	0	1	0	2	0	2	0	170-190	62	regular	
phi001+	2?	2?	0	2	2?	2?	2?	2?	4	4	4?	4	170-190	62	buena	
phi064+	0	1	1	1	3	1	1	1	3	3?	2?	3	80-110	62	buena	
phi083+	2	1?	1	1	2	2	1	2	2	1	1	1	80-110	62	buena	
phi073+	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	120-125	62	buena	
phi072+	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2?	2	2	122-140	62	buena	
phi074+	2	2	2	1?	1?	1?	2	1?	1?	1?	1?	1?	76-202	62	mala	
phi096+	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	80-92	62	buena	
phi092+	2?	1?	2	3	1	1?	2	2	1?	1?	2	3	90-120	62	buena	
phi006	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	62	nula	
nc007	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	62	mala	
phi113	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	194	62	mala	
phi008	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	62	nula	
phi085	2?	0?	0?	2?	3	3	2	3	1	1	1	1	160-180	62	buena	
phi075	2	2	2	2	1?	2	3?	3?	2?	2	3	3?	268-271	62	buena	
phi077	1	1	1	1	2	1	2	1	1	2	1	2	218-220	62	regular	
phi031	2	0	2?	0	1?	1?	0	0	0	1	0	0	234-265	62	regular	
nc009*	0	0	0	0	0	0	0	0	1?	0	0	0	-	62	mala	
phi070*	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	180-194	62	mala	
phi057*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	234	62	mala	
phi034*	2	2?	2?	1	1	1	1?	1	1	1	1	1	218-220	62	mala	
phi114+	2	2	0	2	0	2	2	1	1	2	1	2	194-234	62	buena	
phi082+	2	2	2	1	2	2	1	2	1	2	2	2?	194-200	62	regular	
phi115+	3	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1	180-194	62	regular	
phi014+	1	2?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	228	62	mala	
phi015+	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	130-150	62	mala	
phi017+	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	130-150	62	buena	
phi022+	1	0	2	1	2	1	2	2	0	1	2	1	200-234	62	mala	
phi065+	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	200-234	62	buena	
phi016*	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	200-225	62	regular	
phi059*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	200-225	62	regular	
phi063*	2	2	2	2	1	2	1	1	1	1	2	2	230	62	regular	
phi071*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	234-255	62	mala	
phi062*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	62	nula	
phi084*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	62	nula	

NOTAS : 1= una banda claramente visible, 2= dos bandas; 3= tres bandas ?= no seguro, dudoso; 0= amplificación nula. Electroforesis en gel de agarosa (Metaphor-SeaKem) al 3% (+ doble uso; * triple uso; sin símbolo= un uso) ^a=

Ac7643_{SS}; ^b= Ac7729/TZSRW_{SS} ^a Resultados en geles ^b Temperatura de ensamblaje

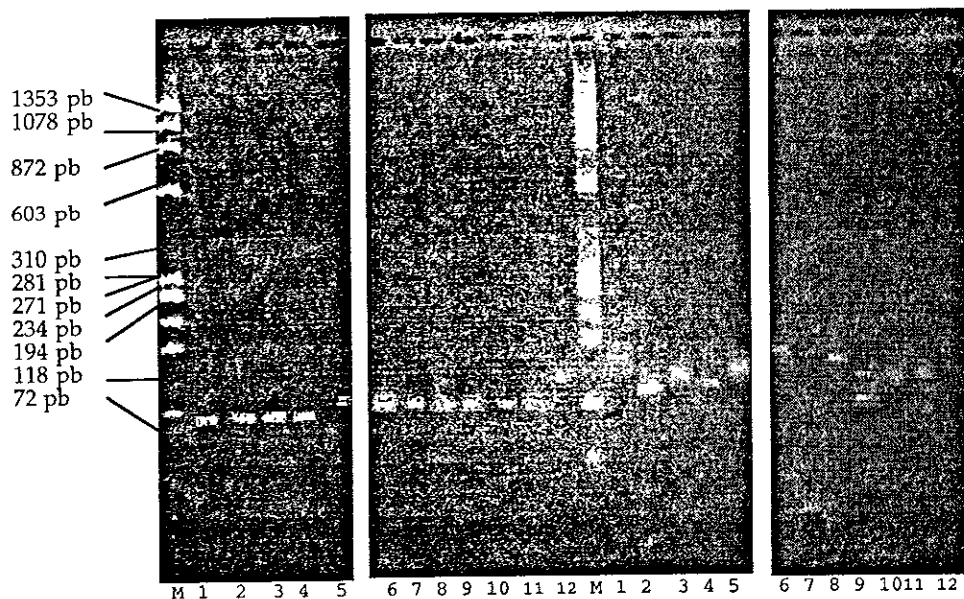


Fig.12. Criba de polimorfismo en panel de progenitores de maíz (*Zea mays*, L.) con iniciadores *mz-adh2* y *gpc1*. Identificación de carriles: M, ϕ X174/*Hae*III; 1, Ki3; 2, CML139; 3, CML131; 4, CML67; 5, CML204; 6, P42; 7, P48; 8, CML247; 9, 3T; 10, 5T; 11, 18B; 12, 20B.

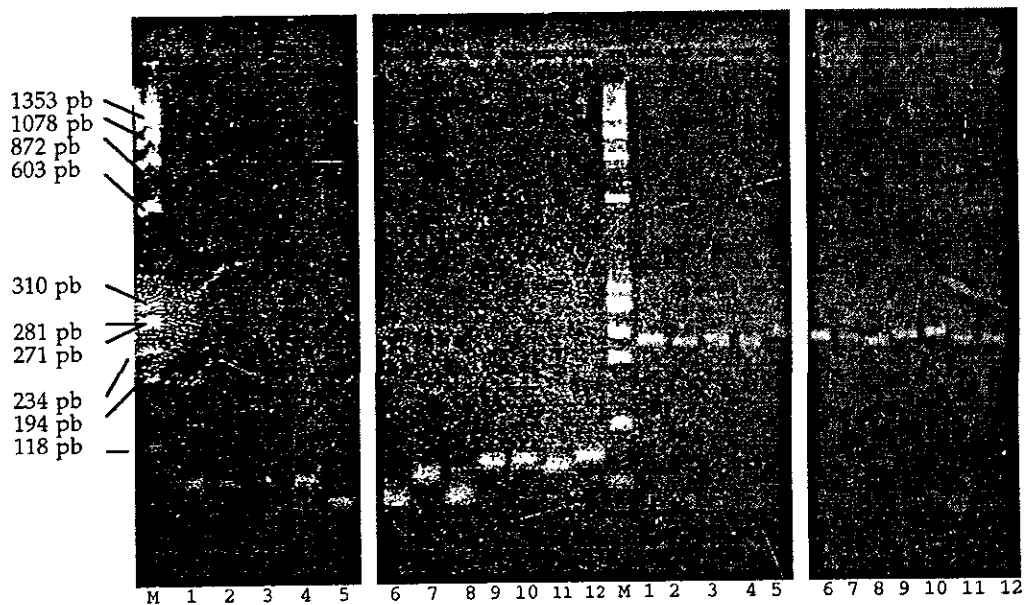


Fig.13. Criba de polimorfismo en panel de progenitores de maíz (*Zea mays*, L.) con iniciadores *phi085* y *phi075*. Identificación de carriles: M, ϕ X174/*Hae*III; 1, Ki3; 2, CML139; 3, CML131; 4, CML67; 5, CML204; 6, P42; 7, P48; 8, CML247; 9, 3T; 10, 5T; 11, 18B; 12, 20B.

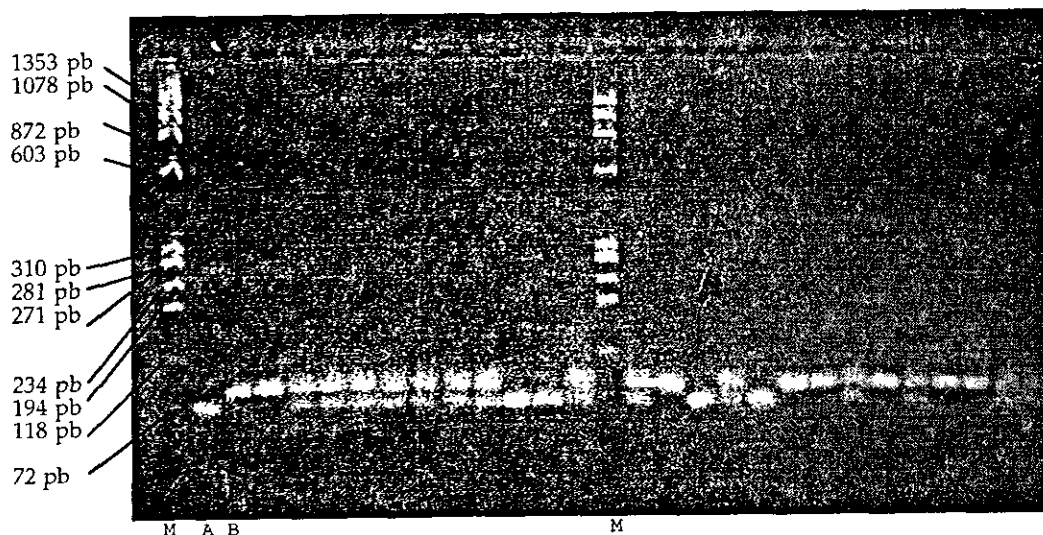


Fig.14. Polimorfismo microsatélite en población F_2 de la cruz P42xP48 de maíz (*Zea mays*, L.), con iniciador *phi085*. Identificación de carriles en gel de agarosa al 3%: M, ϕ X174/*Hae*III; A, P42; B, P48; y algunas muestras de la población.

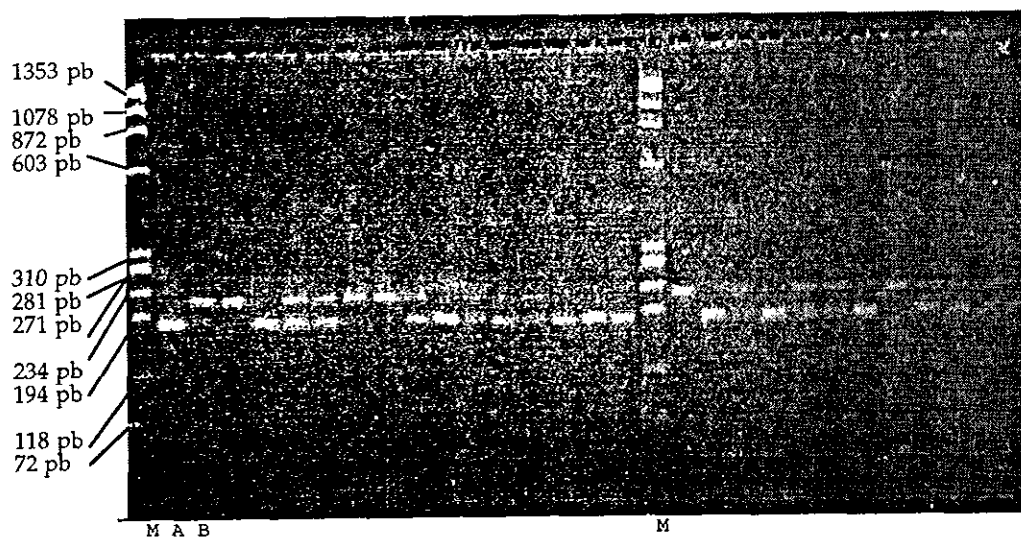


Fig.15. Polimorfismo microsatélite en población F_2 de la cruz P42xCML247 de maíz (*Zea mays*, L.), con iniciador *phi031*. Identificación de carriles en gel de agarosa al 3%: M, ϕ X174/*Hae*III; A, P42; B, CML247; y algunas muestras de la población.

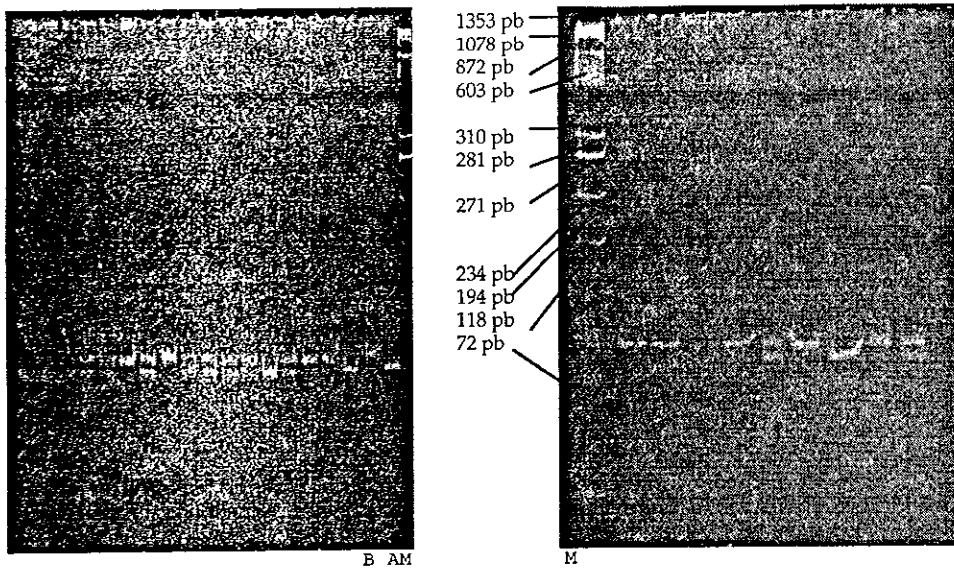


Fig.16. Polimorfismo microsatélite en población F_2 de la cruza Ki3xCML139 de maíz (*Zea mays*, L.), con iniciador *phi083*. Identificación de carriles en gel de poliacrilamida al 6%: M, ϕ X174/*Hae*III; A, Ki3; B, CML139; y algunas muestras de la población.

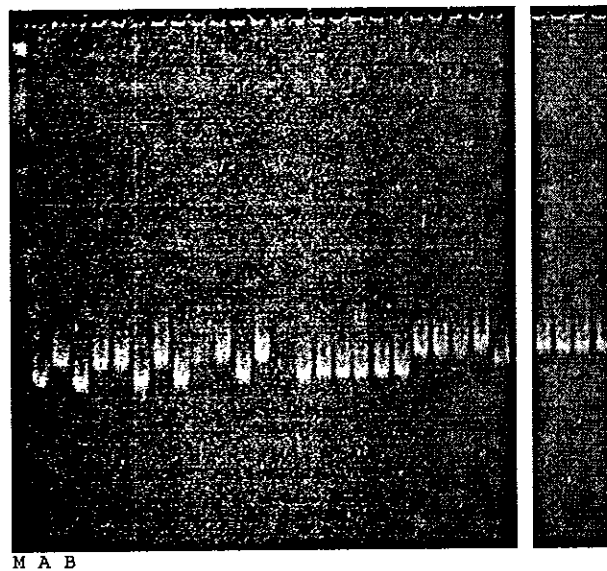


Fig.17. Polimorfismo microsatélite en población *RIL* de la cruza CML67XCML131 de maíz (*Zea mays*, L.), con iniciador *phi082*. Identificación de carriles en gel de poliacrilamida al 6%: M, ϕ X174/*Hae*III; A, CML67; B, CML131; y algunas muestras de la población.

Tabla 18. Polimorfismo genético. Cruzas, individuos seleccionados e iniciadores microsatélites

Cruzadas de progenitores	Individuos seleccionados (26 en total)	Designación de iniciadores microsatélites
P42xP48	5, 6, 9, 15, 18, 21, 22, 23, 27, 28, 31, 35, 43, 47, 48, 49, 50, 53, 59, 60, 61, 62, 68, 75, 76, 77	<i>phi085, phi082, phi083, phi073, phi096, phi077, phi065, gpc1, phi115, phi022</i>
	227, 228, 229, 230, 231, 232, 236, 238, 240, 241, 244, 245, 246, 249, 250, 251, 252, 255, 256, 258, 260, 261, 262, 264, 265, 266	<i>phi114, phi115, phi022, phi063, phi001, phi031, phi073, mz-glb1, phi075</i>
Ki3xCML139	361, 362, 363, 371, 379, 381, 383, 390, 392, 393, 396, 397, 398, 408, 418, 424, 436, 439, 446, 448, 456, 474, 475, 480, 501, 553	<i>gpc1, mz-glb1, phi001, phi065, phi083, phi095</i>
CML131xCML67	161, 165, 175, 190, 200, 205, 216, 220, 222, 224, 231, 248, 263, 269, 273, 278, 280, 285, 287, 293, 296, 299, 300, 303, 307, 314	<i>gpc1, mz-pdk1, phi095, phi072, phi114, phi022, phi082, phi031, phi085, phi001, phi064</i>

El análisis de todos los individuos con los marcadores microsatélites reveló un patrón de segregación codominante mendeliana, independientemente del tipo de población estudiada (F_2 ó RIL). El principio de segregación mendeliana establece que los alelos no tienen un efecto permanente uno sobre el otro cuando se encuentran presentes en la misma planta, y segregan con igual frecuencia —transmisión al azar— en diferentes gametos en una población. Teóricamente, el cociente de segregación de los marcadores codominantes en una población F_2 es 1:2:1 (homocigoto dominante : heterocigoto : homocigoto recesivo), en tanto que para una RIL es 1:0:1 (ó 1:1; homocigoto dominante : homocigoto recesivo) (Strickberger 1976; Welsh 1981; González-de-León *et al.* 1995).

La eventual segregación de los marcadores se analizó mediante pruebas de χ^2 (Tabla 19). Para las poblaciones F_2 se consideraron dos grados de libertad debido a la existencia de tres clases de variables independientes, en tanto que para la población RIL un grado de libertad en el supuesto de dos clases.

Tabla 19. Segregación observada y significancia en el análisis de la distribución de χ^2 para loci microsatélites en poblaciones F_2 y RIL de maíz

Población	Designación del par de iniciadores microsatélite	Locus	Segregación hipotética (A:H:B, A:B) ¹	Segregación observada (A:H:B, A:B) ¹	χ^2	Significancia	Grados de libertad
P42 x P48 (F_2)	<i>phi077</i>	<i>csu94(gfu)</i>	6.5:13:6.5	23:0:0	69	99%	2
	<i>phi082</i>	<i>uaz230(gfu)</i>	6.5:13:6.5	5:16:4	2	N.S.	2
	<i>phi083</i>	<i>prp3</i>	6.5:13:6.5	7:12:5	0	N.S.	2
	<i>phi085</i>	<i>gln4</i>	6.5:13:6.5	4:14:7	1	N.S.	2
	<i>phi022</i>	<i>wx1</i>	6.5:13:6.5	4:13:9	2	N.S.	2
	<i>phi073</i>	<i>gst4</i>	6.5:13:6.5	3:14:8	2	N.S.	2
	<i>phi065</i>	<i>pep1</i>	6.5:13:6.5	2:14:10	5	95%	2
	<i>phi096</i>	<i>zp19/22</i>	6.5:13:6.5	0:0:26	78	99%	2
	<i>phi115</i>	<i>act1+WV64</i>	6.5:13:6.5	0:0:26	78	99%	2
P42 x CML247 (F_2)	<i>mz-glb1</i>	<i>glb1</i>	6.5:13:6.5	4:17:5	8	99%	2
	<i>phi001</i>	<i>ts2</i>	6.5:13:6.5	3:9:12	3	N.S.	2
	<i>phi073</i>	<i>gst404</i>	6.5:13:6.5	7:15:4	1	N.S.	2
	<i>phi031</i>	<i>pl1</i>	6.5:13:6.5	9:12:5	1	N.S.	2
	<i>phi114</i>	<i>oec17-Z26824</i>	6.5:13:6.5	8:11:7	1	N.S.	2
	<i>phi115</i>	<i>act1+WV64</i>	6.5:13:6.5	4:13:8	1	N.S.	2
	<i>phi022</i>	<i>wx1</i>	6.5:13:6.5	9:10:6	2	N.S.	2
Ki3 x CML139 (F_2)	<i>phi001</i>	<i>ts2</i>	6.5:13:6.5	2:16:7	4	95%	2
	<i>phi065</i>	<i>pep1</i>	6.5:13:6.5	9:11:5	2	N.S.	2
	<i>mz-glb1</i>	<i>glb1</i>	6.5:13:6.5	4:9:8	2	N.S.	2
	<i>phi083</i>	<i>prp3</i>	6.5:13:6.5	4:13:9	2	N.S.	2
	<i>gpc1</i>	<i>gpc1</i>	6.5:13:6.5	2:13:6	3	90%	2
CML131x CML67 (RIL)	<i>phi072</i>	<i>mtl1</i>	13:13	7:19	6	95%	1
	<i>gpc1</i>	<i>gpc1</i>	13:13	9:13	1	N.S.	1
	<i>phi001</i>	<i>ts2</i>	13:13	12:13	0	N.S.	1
	<i>mz-pdk1</i>	<i>pdk1</i>	13:13	11:11	0	N.S.	1
	<i>phi095</i>	<i>p1</i>	13:13	12:9	0	N.S.	1
	<i>phi085</i>	<i>gln4</i>	13:13	12:11	0	N.S.	1
	<i>phi114</i>	<i>oec17-Z26824</i>	13:13	12:14	0	N.S.	1
	<i>phi082</i>	<i>uaz230(gfu)</i>	13:13	14:11	0	N.S.	1
	<i>phi031</i>	<i>pl1</i>	13:13	14:10	1	N.S.	1
<i>phi022</i>	<i>wx1</i>	13:13	18:6	6	95%	1	

¹ Homocigoto dominante : Heterocigoto : Homocigoto recesivo; Homocigoto dominante : Homocigoto recesivo.
N.S., no significativo.

El examen del conjunto de los datos de segregación reveló que sólo nueve del conjunto de marcadores de *loci* se desviaron de manera significativa de los cocientes de segregación mendeliana: siete *loci* en poblaciones F_2 y dos en la población *RIL* (Tabla 19).

En general, los datos de los análisis de χ^2 indicaron que este grupo de *loci* detectados por los iniciadores microsatélites se heredaron con valores cercanos a los de aquellas frecuencias alélicas hipotéticas: 1 : 2 : 1 (población F_2) y 1 : 0 : 1 (población *RIL*).

2.3 Construcción de mapas de ligamiento genético

La incorporación de los marcadores microsatélites en mapas de ligamiento cromosómico requirió de los mapas siguientes:

- P42xP48 (Ribaut *et al.* 1996)
- P42xCML247 (Jean-Marcel Ribaut, comunicación personal)
- Ki3xCML139 (<http://192.100.189.39/cimmyt/biotechnology/LinkageMaps/www.html>)
- CML131xCML67 (<http://192.100.189.39/cimmyt/biotechnology/LinkageMaps/www.html>)

En suma, se localizaron 31 *loci* microsatélites en los diferentes mapas de ligamiento, de un total de 35 identificados en la segregación en las poblaciones (Tabla 20). Aquellos *loci* que no se ubicaron en los mapas de ligamiento genético fueron: *gpc1* (con la F_2 de la cruce P42xP48), *phi063* y *phi075* (con la F_2 de la cruce P42xCML247), y *phi064* (con la *RIL* de la cruce CML131xCML67).

Se constituyeron y evaluaron grupos de ligamiento con valores estrictos, resultando en la incorporación casi total en los mapas del conjunto de marcadores microsatélites (Figuras 18-21). Las regiones cromosómicas en las que se ubicaron los microsatélites en cada uno de los mapas eran congruentes con la información recabada de las diversas fuentes hemerográficas y/o electrónicas (MNL⁴⁰ 69, 70, 71; GenBank, MaizeDB).

Los datos del número de *loci* microsatélite y RFLP, así como la longitud de los mapas y la densidad promedio (resultado de dividir la longitud total del mapa entre el número total de *loci*) se presentan en la Tabla 20.

Tabla 20. Resultados cartográficos RFLP-SSR

Cruza de progenitores	Número de <i>loci</i> RFLP-SSR	Número de <i>loci</i> SSR	Longitud total del mapa (cM)	Densidad promedio (cM)
P42 x P48	151	9	1852	13
P42 x CML247	132	7	1903	15
Ki3 x CML139	134	5	1991	16
CML131 x CML67	146	10	1569	11

⁴⁰ En inglés, *Maize Genetics Cooperation Newsletter*.

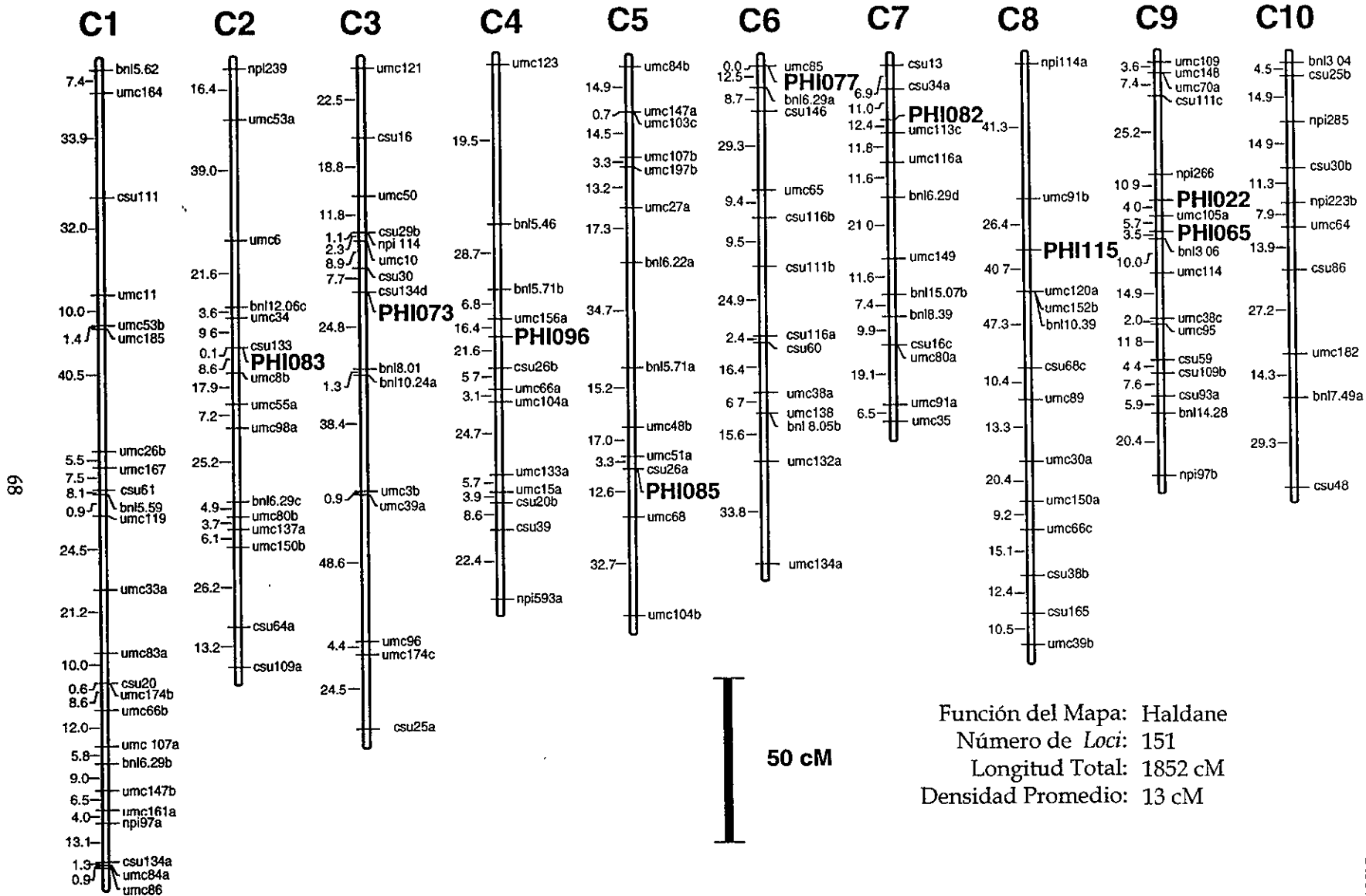


Fig.18. Mapa de Ligamiento RFLP-SSR: Ac7643-S5 X Ac7729/TZSRW-S5.

Se representan con negrillas a los marcadores microsatélites, siendo RFLPs los restantes. Los números que se indican a la izquierda son la distancia de mapa (expresada en centimorgans) entre los marcadores.

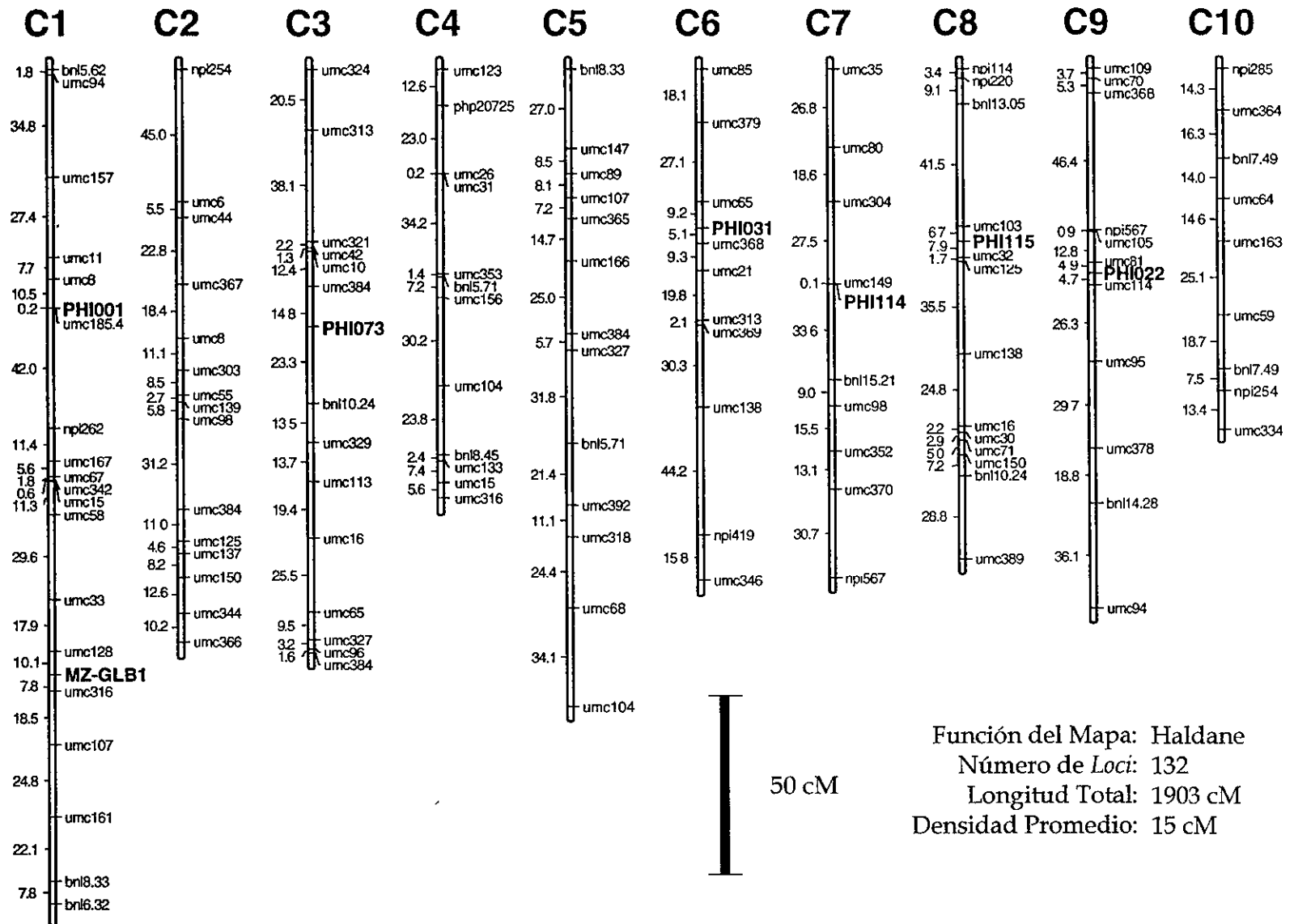


Fig.19. Mapa de Ligamiento RFLP-SSR: Ac7643-S5 X CML247.

Se representan con negrillas a los marcadores microsatélites, siendo RFLPs los restantes. Los números que se indican a la izquierda son la distancia de mapa (expresada en centiMorgans) entre los marcadores.

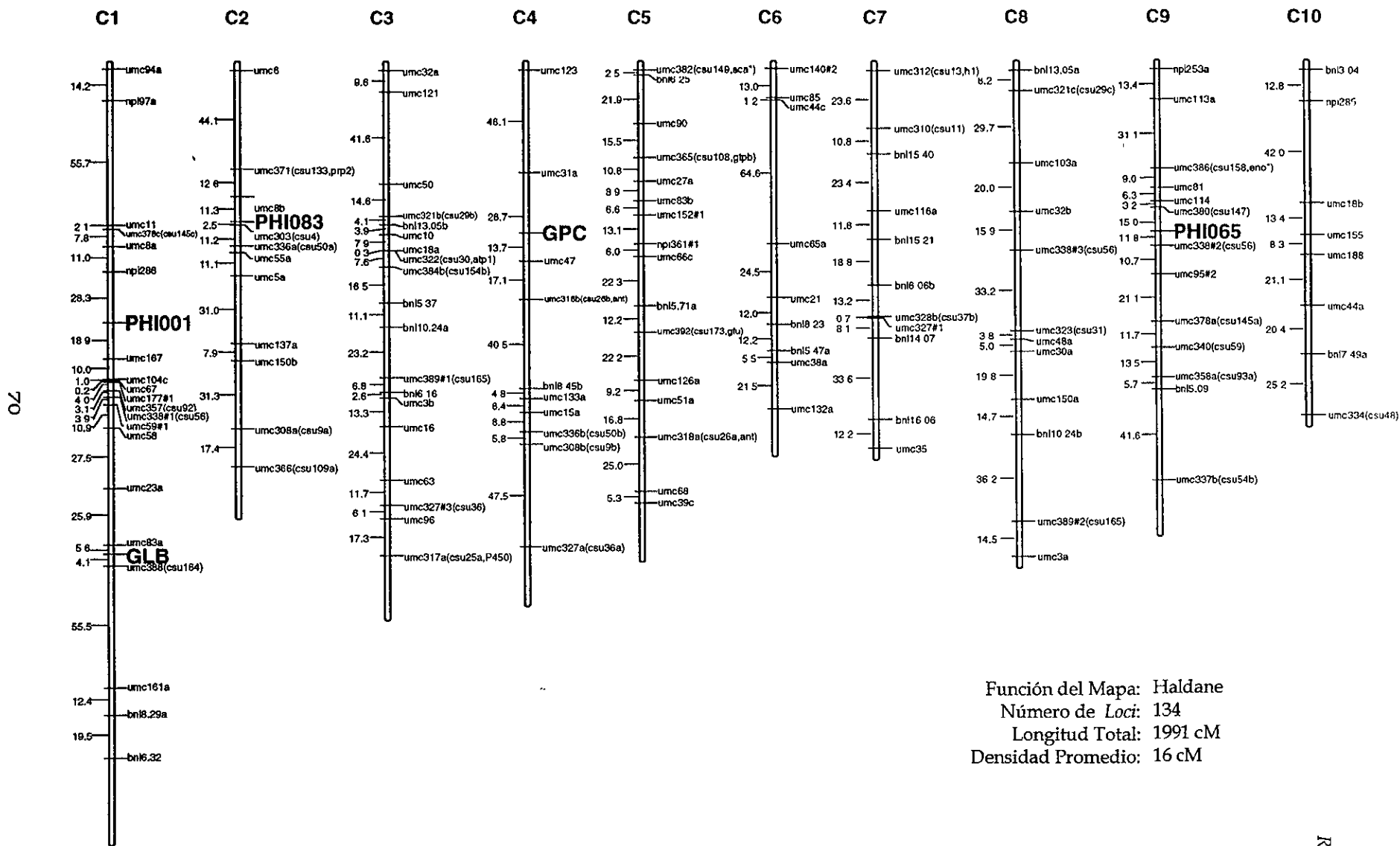
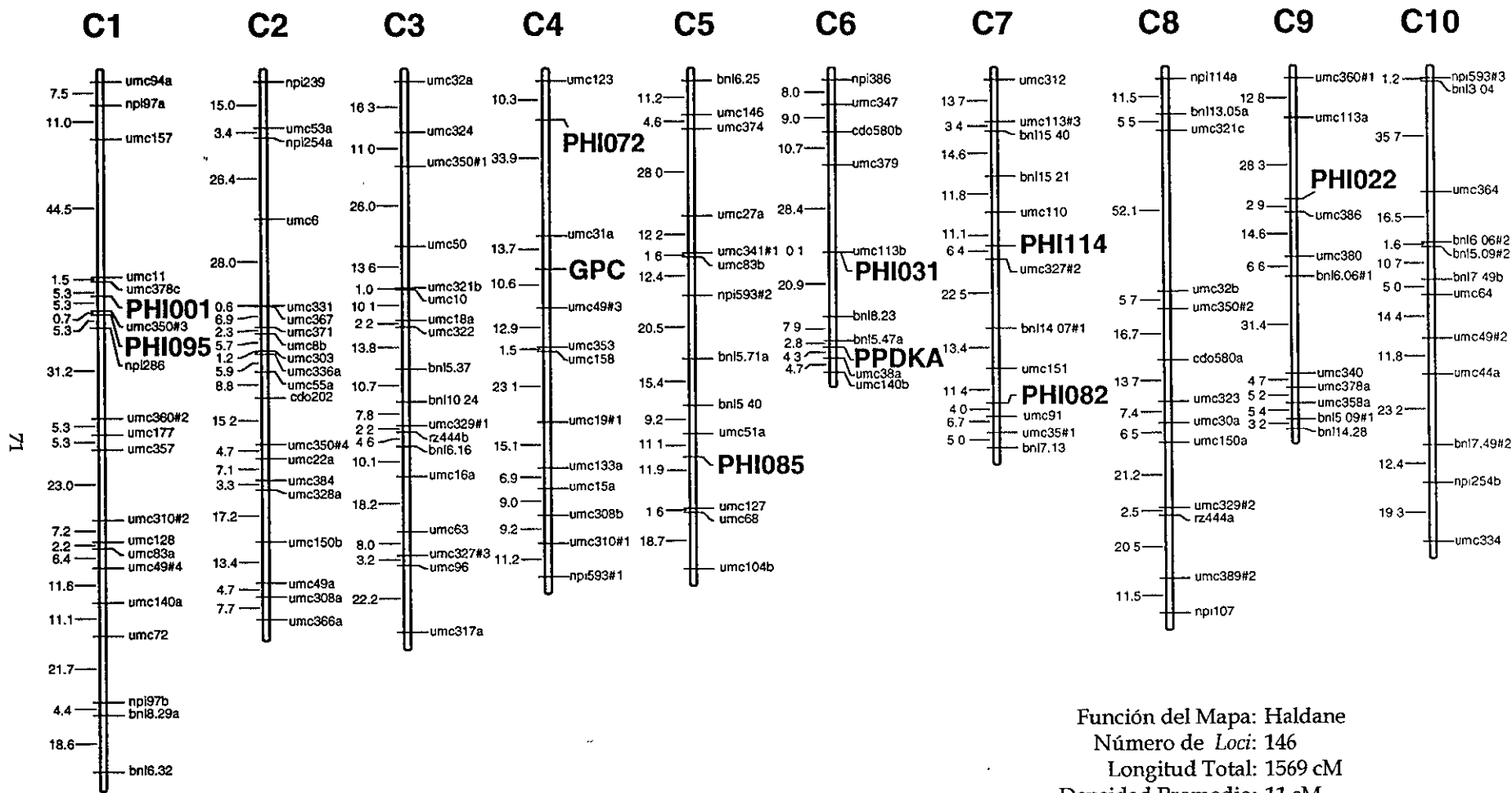


Fig.20. Mapa de Ligamiento RFLP-SSR: Ki3 X CML139.

Se representan con negrillas a los marcadores microsatélites, siendo RFLPs los restantes. Los números que se indican a la izquierda son la distancia de mapa (expresada en centiMorgans) entre los marcadores.



Función del Mapa: Haldane
 Número de Loci: 146
 Longitud Total: 1569 cM
 Densidad Promedio: 11 cM

Resultados

Fig.21. Mapa de Ligamiento RFLP-SSR: CML131 X CML67.

Se representan con negritas a los marcadores microsatélites, siendo RFLPs los restantes. Los números que se indican a la izquierda son la distancia de mapa (expresada en centiMorgans) entre los marcadores.

3- ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL MAÍZ TROPICAL Y SUBTROPICAL

La extracción por fenol:cloroformo (1:1) permitió obtener muestras de ADN de alta pureza, pues se dedujo que se encontraban "libres" de cualesquiera trazas de proteínas. Las trazas residuales de fenol, que podrían inhibir o interferir con la PCR, se removieron con la extracción subsecuente de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y por precipitación etanólica del ADN.

3.1 Lectura de bandas y polimorfismo

Del conjunto inicial de microsatélites utilizados para el examen de la variación genética, se descartó a seis (*phi022*, *phi085*, *phi034*, *phi064*, *phi065*, *phi072*) por evaluarse a los datos resultantes como ilegibles.

Un gran número de polimorfismos se observaron en todas las muestras de maíz tropical y en las accesiones de *Zea luxurians* cuando hubo amplificación; además, se advirtieron bandas múltiples.

Al realizar los análisis sobre geles de poliacrilamida al 6%, se incrementó en gran medida la resolución, visualizándose al menos dos (y hasta siete) alelos de la secuencia amplificada por los microsatélites —p.e., iniciador *phi031*—. Los productos de reacción tuvieron, en general, una longitud de ~70-220 pb.

En una primera apreciación de las fotografías, se consignó la presencia de nutridos números de amplicones por gel. En las tres matrices de datos generadas inicialmente, se definieron y eligieron varios niveles/números de bandas (alelos) por *locus* microsatélite en el conjunto de las accesiones evaluadas. El promedio que se estableció para las clases de alelos "abc" y "ab" fue de alrededor de 23; y, para la matriz de clase "a", de ca. 19.

Luego de la estandarización cualitativa de datos —léase, eliminación selectiva— se manifestó un promedio de alelos en el conjunto de las accesiones, de ~22 (matriz "abc"), ~21 (matriz "ab") y ~17 (matriz "a"). Esto es, un decremento en el número de bandas a computar en el análisis de las accesiones/líneas. La idea: escoger a los alelos más informativos por *locus*.

Los *loci* más informativos (en los geles de agarosa y poliacrilamida) fueron *phi001*, *phi015*, *phi031*, *phi077*, *phi083*, *phi114*, *gpc1* y *mz-adh2n* (ejemplificado en las Figuras 22-24).

3.2 Mezcla (*bulking*) de muestras

El experimento de mezcla de muestras (*Sample Bulking*) con los distintos grupos de la accesión Veracruz141 (α , β y χ) permitió observar que la migración de las muestras durante la electroforesis sobre cualesquier geles era idéntica a la registrada de manera individual. No hubo traslape de las bandas, mas fue difícil discernir a cual de las muestras correspondía cual alelo (Figs. 22-24). La variación intraaccesión, representada por Veracruz141B, fue informativa en cuanto al registro de bandas adicionales (con respecto a la accesión Veracruz141); de aquí que se le considerase para los análisis de conjunto.

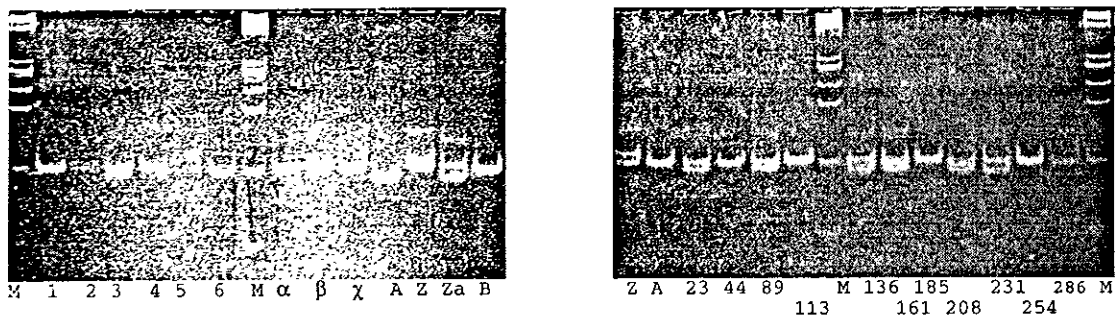


Fig.22. Polimorfismo microsatélite con iniciador *mz-adh2*. Identificación de carriles en gel de poliacrilamida al 6%: M, ϕ X174/*Hae*III; controles: A, Mo17; B, CML247; C, B73. *Zea luxurians*: Za, NicaraguaA; Zb, NicaraguaB; Zg, Guatemala. Se presentan los números correspondientes a las de muestras de accesiones de maíz tropical y los grupos de Veracruz141: α , β y χ .

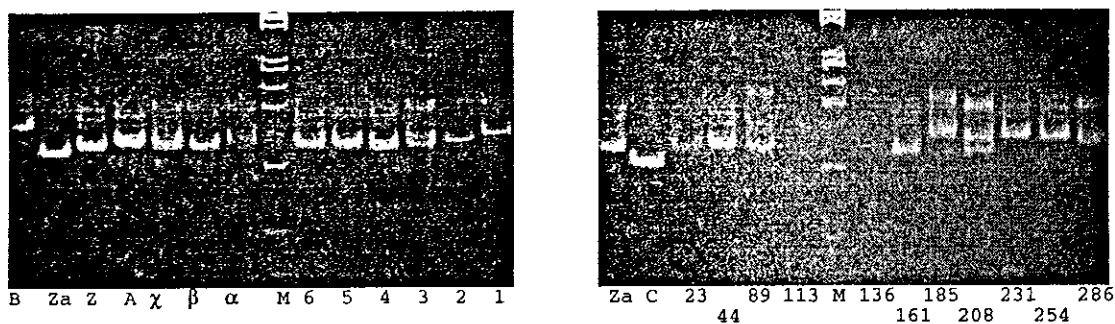


Fig.23. Polimorfismo microsatélite con iniciador *gpc1*. Identificación de carriles en gel de poliacrilamida al 6%: M, ϕ X174/*Hae*III; controles: A, Mo17; B, CML247; C, B73. *Zea luxurians*: Za, NicaraguaA; Zb, NicaraguaB; Zg, Guatemala. Se presentan los números correspondientes a las muestras de accesiones de maíz tropical y los grupos de Veracruz141: α , β y χ .

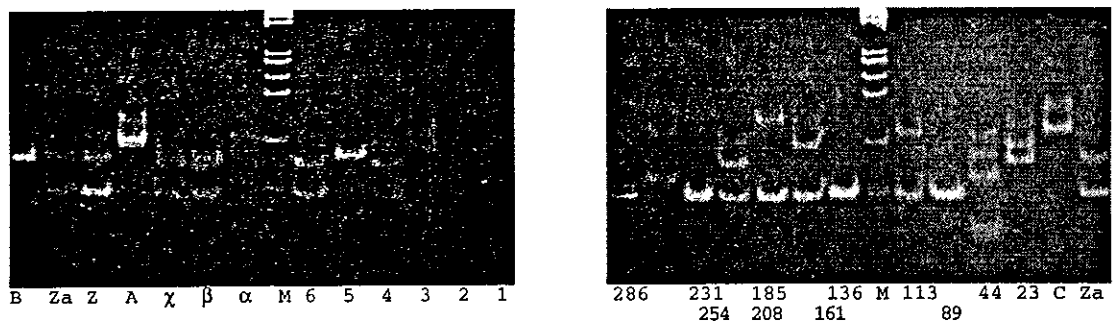


Fig.24. Polimorfismo microsatélite con iniciador *phi001*. Identificación de carriles en gel de poliacrilamida al 6%: M, ϕ X174/*Hae*III; controles: A, Mo17; B, CML247; C, B73. *Zea luxurians*: Za, NicaraguaA; Zb, NicaraguaB; Zg, Guatemala. Se presentan los números correspondientes a las muestras de accesiones de maíz tropical y los grupos de Veracruz141: α , β y χ .

3.3 Coeficientes de similaridad y análisis de conglomerados

Al analizar el encadenamiento completo de las accesiones de maíz tropical, subtropical y testigos para las tres matrices de datos "a", "ab" y "abc", se consideraron más descriptivas a las representaciones resultantes del cálculo con el coeficiente de similaridades s_5 (coeficiente de Anderberg) y con las supresiones *pairwise* de datos faltantes. Las clasificaciones jerárquicas aglomerativas —por fusión sucesiva de las entidades en grupos— se representaron por estructuras de árbol invertidas (dendrogramas), en espacios bidimensionales que ilustraran las fusiones realizadas en cada etapa sucesiva del análisis (Fig.25).

Comparativamente, los patrones estructurales entre los dendrogramas producidos por las funciones de similaridades s_3 y s_5 con supresión *pairwise* eran muy similares entre sí. Se eligió a aquellos dendrogramas generados con el coeficiente s_5 por tener mayor relación con la información morfoagronómica de Taba *et al.* (1994), que aquellos elaborados mediante coeficientes s_3 y s_5 con supresión *listwise*.

El dendrograma del conglomerado de la matriz "a" (Fig.25) muestra, cuando menos, cuatro grupos:

- I. los *Zea luxurians* Nicaragua (A y B), y las accesiones Tamaulipas125, ~~Veracruz141~~^{Nº}, Veracruz207, Veracruz223, el compuesto intracesión Veracruz 141B, Michoacán182, Sinaloa95, Nayarit284 y Veracruz193;
- II. el teocintle Guatemala aislado;
- III. las accesiones Veracruz141, Veracruz158, Veracruz145 y Nayarit173, caracterizados por pertenecer a las razas Tuxpeño típico o Tuxpeño; y,
- IV. las líneas endogámicas del *Corn Belt* estadounidense (Mo17 y B73) y el probador CML247.

La concatenación en los dendrogramas de los conjuntos matriciales "ab" y "abc" (Fig.25) —comparativamente muy similares entre sí—, verifica seis grupos:

- I. la accesión Nayarit173;
- II. aquel de las accesiones Veracruz207, Veracruz223, Veracruz141B, Tamaulipas125, Veracruz141, Veracruz158 y Veracruz145, quienes comparten cualesquiera de los germoplasmas Tuxpeño, Tuxpeño típico o Tepecintle;
- III. las líneas de la denominada "Faja Maicera";
- IV. las accesiones de razas misceláneas Veracruz193, Sinaloa95, Nayarit284 y Michoacán182;
- V. los teocintles (Nicaragua y Guatemala); y,
- VI. el probador CML247.

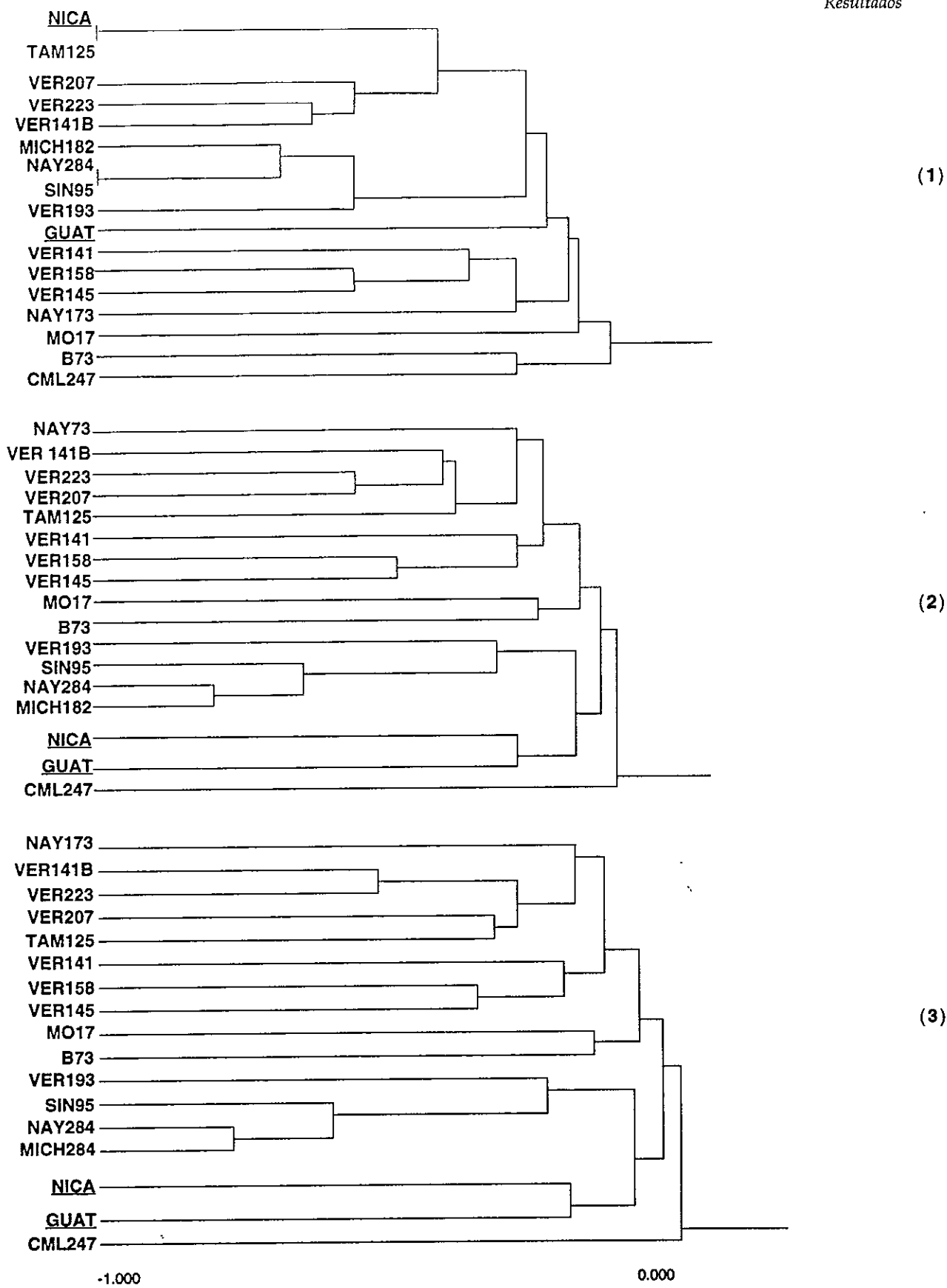


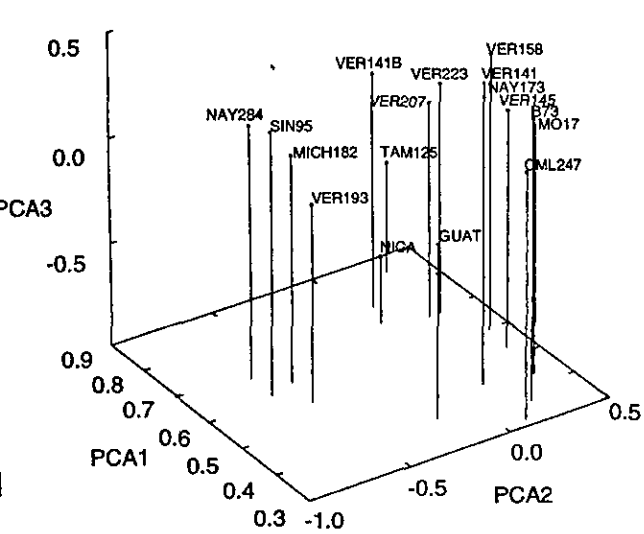
Fig.25. Dendrogramas de los resultados de los análisis de conglomerados sobre las matrices de diferencias calculadas por el coeficiente de similitud s_5 , derivadas de comparaciones *pairwise* para los conjuntos matriciales de datos: "a" (1); "ab"(2) y "abc"(3).

3.4 Análisis de componentes principales (ACP)

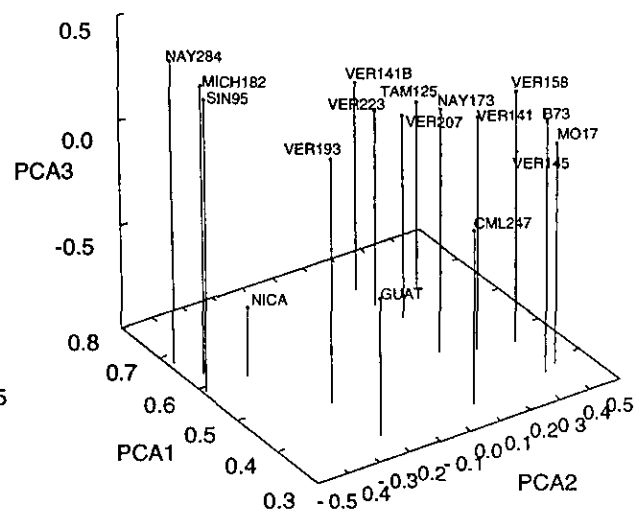
Mediante el análisis de componentes principales (ACP) se estudió a las entidades en función del coeficiente de similaridad s_5 y de la supresión *pairwise*. Los valores que explican los primeros cuatro componentes en cuanto a la varianza total son disímiles cuando se comparan las tres matrices de datos. Para el conjunto matricial "a": 36, 13, 11 y 6%; para "ab": 30, 11, 9 y 6%; y, para la matriz "abc": 29, 11, 9 y 6%.

En general, los resultados del ACP (Fig.26) fueron congruentes con aquellos derivados de los análisis de conglomerados. En la figura 25 se aprecia la complicada y no bien definida estructura del grupo I, separado del resto por el factor 1 (ACP1); éste y el factor 3 (ACP3), lo escinde en tres subgrupos: el de Nayarit284, Sinaloa95, Michoacán182 y Veracruz193; aquel de Veracruz 141B, Veracruz223, Veracruz207, Tamaulipas125 y el *Zea luxurians* Nicaragua (A y B); y, aísla al teocintle Guatemala. El factor 2 (ACP2) permite distinguir a estos dos últimos subgrupos. Permanecen iguales los grupos III y IV, sólo separados por el ACP1.

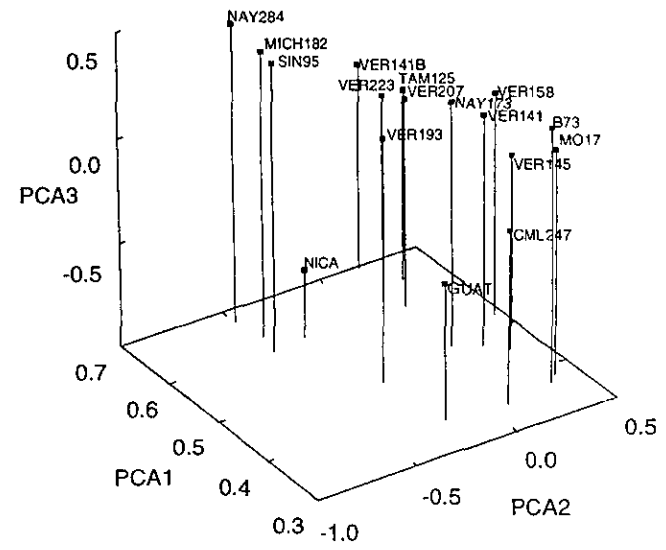
Derivado del estudio de la Figura 26, se estableció la permanencia de los grupos I, II y III, distribuidos por el ACP1; ésto, acorde con lo observado en los dendrogramas correspondientes. El ACP1 diferencia a Veracruz 193 del grupo IV, y al *Zea luxurians* Nicaragua (A y B) del V, integrándole al IV —es de notar el hecho de que tal ACP considera a A y B como uno solo—. El ACP2 divide al grupo V, confirmando a CML247 en el medio entre el teocintle Guatemala y las líneas de la denominada "Faja Maicera"; por otra parte, sí considera a Veracruz193 como constituyente del grupo IV. En tanto, el ACP3 segrega al teocintle Nicaragua de todos los conglomerados.



(1)



(2)



(3)

Fig.26. Análisis de Componentes Principales (ACP) del estudio de diversidad genética con marcadores microsatélites de 17 accesiones de maíz tropical y subtropical para las matrices de datos "a" (1), "ab" (2) y "abc" (3), utilizando el coeficiente de similitud s_5 y la función de supresión *pairwise*.

DISCUSIÓN

1 - ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

1.1 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS

1.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa y temperaturas de ensamblaje

Las modificaciones en los cálculos de las concentraciones y volúmenes de reacción de los reactivos se rigieron por la eficiencia de la polimerización del fragmento a obtener. La concentración final de $MgCl_2$ demostró ser lo suficientemente adecuada para la mayoría de las reacciones, teniendo en consideración que forma un complejo soluble con los desoxi oligonucleótidos, incrementa la interacción iniciador/ADN patrón y estimula la actividad de la polimerasa (Saiki 1989; Newton y Graham 1995).

Determinar la concentración de los iniciadores requirió analizar el conjunto de las secuencias de los iniciadores microsátélites, así como la cantidad de la muestra de ADN vegetal (Saiki 1989b).

En el diseño de los ciclos térmicos para las PCR se contempló incubar las muestras a las temperaturas definidas. Para tal efecto, fue fundamental considerar la longitud y el contenido de guanina y citosina de los iniciadores, así como la tasa de polimerización óptima de la enzima polimerasa *Taq* del ADN (Wang *et al.* 1994; Saiki 1989a,b).

No hubo otra razón en la incorporación del glicerol, que la de ser un promotor de la reacción. La adición de aceite mineral previno la evaporación, evitó la contaminación de muestra a muestra, y aseguró la eficiencia de la PCR.

El diseño específico de los pares de iniciadores microsátélites para el ensamblaje de las secuencias flanco es, con mucho, uno de los factores más importantes para la hibridación con el ADN substrato. El otro parámetro que abrevia en la obtención de resultados consistentes es la temperatura de ensamblaje.

1.1.2 Electroforesis y detección

La electroforesis de un marcador molecular de bandas restringidas de tamaño estándar ($\phi X174/HaeIII$) adjunto a las muestras analizadas permitió una determinación aproximada de la identificación y tamaño de los amplicones.

Siendo alternativo y complementario el uso de los geles de poliacrilamida a los de agarosa, se incrementó la resolución de cada uno de los alelos de un *locus* (Ribaut *et al.* 1997). Se elegiría como soporte electroforético en trabajos rutinarios y de manejo de grandes volúmenes de muestras cuando se utilizaran marcadores microsátélites.

La metodología de tinción por bromuro de etidio de los fragmentos de amplificación separados en ambos sistemas de geles permitió una manipulación rápida, al ser un método no radioactivo (Hoisington *et al.* 1994). Deben guardarse las precauciones y cuidados convenientes, ya que es un agente químico altamente mutagénico, teratogénico y cancerígeno (Johnson y Grossman 1977; Sambrook *et al.* 1989; Voet y Voet 1990; Hoisington *et al.* 1994).

2- CARTOGRAFÍA

2.1 Estudio del polimorfismo microsátélite en las poblaciones en segregación F_2 y RIL

En los experimentos, los individuos aleatoriamente escogidos de las poblaciones resultantes de las cruzas P42xP48, P42xCML247, Ki3xCML139 y CML131xCML67, mostraron amplificación de las secuencias interjacentes —léase microsátélites—, con permanencia estable de los patrones en las progenies (Saghai-Marooft *et al.* 1994).

Aun cuando es factible, para efectos de sondeo, escrutinio y preselección, estudiar la diferenciación en el nivel molecular de una población total con tan sólo una muestra representativa (Hoisington *et al.* 1989; Burr 1994), es recomendable emplear el mayor número posible de individuos de una población sujeta a estudios cartográficos (Hanson 1959; Ribaut *et al.* 1997). Se reduce el valor del error estándar de la frecuencia de recombinación para marcadores codominantes cuanto mayor sea la progenie incluida en el proyecto cartográfico (Wanous *et al.* 1997).

En efecto, la herencia de los marcadores moleculares microsatélites se reveló de manera codominante mendeliana (Morgante y Olivieri 1993), independientemente del tipo de población analizada. En general, los análisis de χ^2 indicaron una herencia similar a aquella calculada con frecuencias alélicas para este tipo de marcadores. Con respecto a las poblaciones F_2 se heredaron los alelos correspondientes a los progenitores de manera clásica 1 : 2 : 1. En tanto que con las *RIL*, derivadas de plantas F_2 a partir de una sola semilla en por lo menos 5-6 generaciones y que se supone contienen una diferente combinación de bloques de ligamiento a partir de los progenitores originales, se observó una 1 : 0 : 1, ó 1 : 1 (González-de-León *et al.* 1995).

La distorsión de segregación que manifiestan algunos marcadores (de 90, 95 y 99%) puede ser el resultado de un registro erróneo de los datos en las fotografías o la asignación de categorías alélicas equivocadas; o, que los marcadores segreguen de manera no mendeliana, lo que derivaría en complejas formulaciones teóricas que no alcanza a elucidar el que suscribe lo presente; o, que los valores para la interpretación de los resultados de χ^2 hayan sido muy estrictos.

Exhibido por las diversas muestras de ADN, el polimorfismo se interpretó como la variación en el número de repeticiones en serie presentes en diferentes alelos en el mismo *locus* (Beckmann y Soller 1990).

2.2 Construcción de los mapas de ligamiento genético

En la construcción de los mapas de ligamiento genético (conformados originalmente por marcadores RFLP) se incorporó a la gran mayoría de los *loci* encontrados en las posiciones cromosómicas previstas (Tabla 11). Al conformar los grupos de ligamiento en los mapas cromosómicos, se insertaron en la región cromosómica para la cual se esperaba fuesen ubicados (Senior *et al.* 1995 y 1996; GenBank y Maize DB). Aquellos marcadores que no se integraron en orden ni grupo de ligamiento alguno bien fue porque las posiciones asignadas se ubicaron a una distancia enorme con respecto del marcador más cercano, bien porque los resultados (visualizados en las fotografías de los geles) se evaluaron como ilegibles.

Mediante el programa "MapMaker" versión 2.0 (Lander *et al.* 1987) se desempeñó el análisis multipunto: simultáneamente, varios órdenes posibles fueron determinados aprovechando la información meiótica que aportaron los marcadores adyacentes en lo que respecta a los eventos de recombinación, así como el orden que guardan entre sí (Hulbert *et al.* 1990; Lorieux 1994; González-de-León *et al.* 1995). El orden de los marcadores se modificó por la información adicional que se introdujo al sistema, y por los posibles errores que devengan del cálculo de un número tan reducido de datos.

El ligamiento de los marcadores se determinó con valores $LOD \geq 3.0$ y $\Theta \leq 0.40$, haciendo uso de la función de recombinación de Haldane (Haldane y Waddington 1931). Ésta describe los cálculos de ligamiento considerando que cualesquier eventos de recombinación entre dos *loci* disminuyen la probabilidad de que suceda otro entrecruzamiento cromosómico en las regiones adyacentes en el mapa de ligamiento (Lorieux 1994; González-de-León *et al.* 1995).

Comprobar el orden de los grupos de ligamiento y el establecimiento de los mapas de ligamiento instrumentando el comando *ripple* del programa fue concluyente: se le utilizó al final del análisis para confirmar el orden *correcto* de todos los tripletes de marcadores adyacentes en el contexto de la secuencia completa de un grupo de ligamiento (*i.e.*, un cromosoma).

De la totalidad de los marcadores, sólo unos cuantos no se localizaron en ningún segmento cromosómico, bien por la no incorporación en grupo de ligamiento alguno, bien porque la posición asignada en un cromosoma se ubicaba a una distancia enorme con respecto del marcador más cercano, imposibilitando concebir un mapa; esto, podría ser consecuencia de el número reducido de muestras que derivaría en errores de cálculo del ligamiento entre los marcadores.

Los cuatro mapas de ligamiento cromosómico suponen ligamientos sólidos⁴¹ entre los *loci* "objetivo" y los marcadores, teniendo en cuenta que teóricamente (Tanksley 1983; Helentjaris *et al.* 1985), para que todo mapa de ligamiento de maíz posea una confiabilidad del 99%, se debe presentar una distribución uniforme de *loci* marcadores de ~20 cM en todo el genoma.

3- ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL MAÍZ TROPICAL Y SUBTROPICAL

3.1 Datos, lectura y número de marcadores

La lectura y comparación de los patrones de bandas en los geles es subjetiva por carecer de parámetros fiables, además de exigir un número considerable de horas-hombre. Para obviar todo lo anterior y obtener la obligada precisión en los análisis de diversidad genética, se requeriría de la digitalización del registro de datos (González-de-León *et al.* 1989; Hoisington y González-de-León 1993).

El análisis de la diversidad de maíz tropical y subtropical se fundamentó en el nivel de polimorfismo detectado en los *loci* de secuencias simples de repetición (microsatélites). En efecto, se observó una alta variación alélica cuando se examinaron las accesiones pertenecientes al complejo racial Tuxpeño y en los maíces subtropicales *Zea luxurians*. No obstante, el número evaluado en este estudio es insuficiente. Se reclama utilizar mayor número de marcadores microsatélite (~200-300) y una vasta cantidad de accesiones (>200) para establecer veraces análisis de conglomerados y de relaciones filogenéticas (González-de-León *et al.* 1989) en el complejo racial Tuxpeño y en teocintles, que sirvan de paradigma para trabajos posteriores.

Aquí se analizó un número por demás reducido de bandas (alelos) por *locus* microsatélite (nueve en total). Cantidad por demás limitada si se planea la descripción molecular de las diferencias genéticas. El decremento selectivo del número de bandas en las matrices de datos finales no fue dirigido con otro objetivo que el de evitar contemplar artefactos de amplificación o subproductos de reacción como si fuesen alelos del *locus* en estudio. Enfoque válido, por cuanto se aseguró el manejo de un número *más veraz* de la información alélica evidenciada.

Los patrones complejos de bandas con un solo par de iniciadores sugeriría la amplificación de *loci* polimórficos, o la existencia de *n* alelos diferentes en la poza genética estudiada (Saghai-Marouf *et al.* 1994; Ma *et al.* 1997; Provan *et al.* 1996; Akagi *et al.* 1997). El hecho de haber registrado numerosos alelos por *locus* puede ser consecuencia de la condición hipervariable de estas regiones o, de la detección de *loci* relacionados (inespecificidad de la PCR o de los oligonucleótidos).

3.2 Estudios de conglomerados y ACP

Primordialmente, fueron razones de orden germoplásmico las que se elucidaron en la formación de conglomerados. La clasificación sistemática del maíz (Wellhausen *et al.* 1951; Wellhausen 1988) ha considerado a las razas Tuxpeño, Tuxpeño típico, Tepecintle, Vandeño y Celaya como estrechamente relacionadas (Brown y Goodman 1977; Taba *et al.* 1994; Taba 1995). Específicamente, el Tepecintle, Tuxpeño y Vandeño son razas mestizas prehistóricas, en tanto que el Celaya es una raza moderna incipiente; todas, oriundas de varias regiones de México.

El estudio de conglomerados tuvo como referencia aquel de Taba *et al.* (1994), producido a partir de determinaciones morfoagronómicas. Los conglomerados allí expuestos brindaron una idea —por demás vaga— de los ordenamientos que podrían tener las múltiples accesiones de maíz tropical. Teniendo en consideración que cada una de las accesiones analizadas correspondían a diferentes conglomerados en ese estudio, fue difícil relacionarles

⁴¹ Se establece un *ligamiento sólido* cuando existen <5cM entre el marcador y el "*locus* objetivo".

cabalmente. Adicional a ésto, fue la ausencia de datos morfoagronómicos con los cuales se correlacionaran los moleculares y, así, profundizar en el estudio. Existen ejemplos del uso de marcadores microsátélites en *fingerprinting* y diversidad genética (Phelps *et al.* 1996; Bird *et al.* 1997; Mladenovic-Drinic y Konstantinov 1997), en donde es toral la correlación inicial con evaluaciones agronómicas para predicciones posteriores derivadas del análisis molecular.

Realizar los análisis de datos con técnicas de variación múltiple —estudio de conglomerados y análisis de componentes principales—, permitió describir a los objetos como un conjunto de mediciones numéricas. Asimismo, permitieron diseñar un esquema de clasificación para el agrupamiento de los objetos en un número de clases en el que los objetos contenidos compartiesen similitudes en un aspecto tal que les diferenciasen de aquellos de otras clases.

Método de descomposición de una matriz de correlación o covarianza, el análisis de componentes principales tuvo como objetivo resumir el conjunto de datos de variables múltiples tan acuciosamente como fuera posible.

Una vez desarrollado el análisis del componente principal, se definió el segundo componente, perpendicular al primero. Así, el primero de los componentes resumió lo más posible de la variación conjunta, el segundo lo restante; el tercero explicó, sucesivamente, el valor del resumen residual. Descrito un considerable porcentaje de la varianza total, se decidió no establecer más componentes.

Emplear a B73 y Mo17 como materiales comparativos consideró su relación racial (Brown y Goodman 1977), lo que permitía preconcebirles dentro de un mismo conglomerado —con una localización bastante separada entre sí—. Se demostró la ubicación distante con respecto de las demás accesiones de maíz. Igualmente, los resultados comprobaron que el probador CML247 no posee relación directa con las accesiones evaluadas (McLean *et al.* 1997).

Los resultados del dendrograma 1 en la Figura 25, donde se da cuenta de la separación del grupo I en tres subgrupos, se explicarían por el hecho de que Veracruz 141B, Veracruz207, Veracruz223 y Tamaulipas 125 son accesiones que derivan del germoplasma Tuxpeño. Así, se diferencian de los otros dos subgrupos (uno misceláneo y el otro, un *Zea luxurians* Guatemala).

El que se haya concebido a las *muestras* A y B de *Zea luxurians* Nicaragua como una sola, luego de la incorporación de los datos correspondientes a las bandas de mediana y baja intensidad es consecuencia directa de la igual lectura de alelos. De aquí que se haya eliminado la muestra B de las figuras 25 y 26, a riesgo de crear confusiones.

La distinta ubicación de Veracruz 141 y Veracruz141B —el segundo, un compuesto intraaccesión del primero— en los estudios de conglomerados y componentes principales [que se presentan en el capítulo “Resultados”], es producto de la variación de alelos registrada por la lectura de un número mayor de muestras.

La similitud de las concatenaciones de los dendrogramas y de los análisis de ACP para los conjuntos matriciales “*ab*” y “*abc*”, definidos por los coeficientes de similaridad s_5 y la supresión *pairwise*, es indicativo del valor no definitivo que en este caso aportan los datos correspondientes a la más baja intensidad.

El análisis de componentes principales para las matrices de datos “*ab*” y “*abc*” confirma lo estipulado en el párrafo anterior: las disposiciones espaciales del agrupamiento de la denominada “Faja Maicera”, el de los teocintles, y del megagrupo conformado por las accesiones que comparten un origen germoplásmico Tuxpeño, Tuxpeño típico o Tepecintle.

3.3 Mezcla (*bulking*) de muestras

Con los resultados de la variación intraaccesión en Veracruz141B queda más que demostrada la valía del estudio intraaccesión. Resultó tan informativa la definición de las variaciones alélicas, que se le consideró como una entidad distinta a la original (Veracruz141) para los estudios de conglomerados y ACP.

CONCLUSIONES

Las metodologías de marcaje molecular permiten comprender indirectamente las bases genéticas que sustentan numerosos mecanismos que ocurren en el nivel del ADN, y proveen de poderosos métodos para la cartografía y manipulación individual del *locus* (o de los *loci*) asociado(s) con la expresión de ciertos rasgos o caracteres. El uso efectivo de marcadores moleculares aunado a las prácticas tradicionales, permitirá el advenimiento de avances significativos en las estrategias de fitomejoramiento y selección vegetal.

Los microsatélites, también denominados secuencias simples de repetición, se han convertido en una fuente importante de marcadores moleculares. Por sus características y propiedades, se han considerado (algunas) posibilidades de aplicación teórica y práctica en el fitomejoramiento:

1. Investigación en cartografía cromosómica/genética.
2. Integración y complementación de mapas de ligamiento cromosómico en combinación con otros tipos de marcadores moleculares.
3. Establecimiento de mapas de ligamiento de alta densidad.
4. Criba rápida y confiable de polimorfismos genéticos en poblaciones.
5. Detección de marcaje y manipulación de caracteres cuantitativos.
6. Escrutinio de poblaciones en segregación para selección asistida por marcadores.
7. Exploración de variabilidad genética y de conservación de sitios en los cromosomas de diferentes individuos y poblaciones de la misma especie.
8. Estudios filogenéticos y de huellas genéticas (*fingerprinting*).
9. Determinación de la diversidad genética de accesiones/cultivares de importancia en el Fitomejoramiento.
10. Estudios de heterosis.
11. Verificación de sintenia.
12. Sustento de investigaciones de homeología cromosómica en distintos taxones o especies.
13. Análisis de eventos moleculares de mutación puntual, inserción y supresión de secuencias.
14. Generación de bases de datos de las secuencias de amplificación y flancos (adyacentes).

En el presente estudio se han evaluado con la metodología de marcaje molecular microsatélite, dos aplicaciones de importancia mayúscula en el estudio de la genética del maíz y del teocintle:

- la cartografía cromosómica, y
- el estudio de la diversidad genética.

Teóricamente, la cartografía sustentada en marcadores requiere que posean las características siguientes:

- i. Polimorfismo verificable.
- ii. Herencia mendeliana.
- iii. Independencia de interacciones genotipo-ambiente.
- iv. Abundancia genómica.
- v. Distribución uniforme.

Luego, cumplen los microsatélites con lo anterior. Resultaron sumamente polimórficos; detectan, con alta sensibilidad, variaciones en la secuencia del ADN.

Experimentalmente, los microsatélites son marcadores codominantes, específicos para un solo *locus*, aun cuando pueden revelar varios alelos por *locus*, según la técnica de análisis de los productos de reacción. Detectaron variación sólo dentro del fragmento de ADN amplificado y en secuencias flanco.

La herencia de los marcadores moleculares se rigió de manera clásica mendeliana, independientemente de la población en estudio.

Siendo los microsatélites un sistema de marcadores moleculares que localizó un enorme número de *loci* o de grupos de ligamiento a todo lo largo del genoma nuclear, son considerados de enorme utilidad en la conformación de mapas de ligamiento genético.

Las fluctuaciones ambientales (y la interacción genotipo-ambiente) no afectaron en forma alguna el análisis molecular. Las interacciones epistáticas desfavorables a menudo aparecen entre los *loci* que codifican para los caracteres morfológicos y limitan el número de marcadores segregantes tolerables o erróneamente registrados en una sola población segregante. En contraste, los marcadores moleculares —como los microsátélites— parecieron estar libres de efectos epistáticos; por lo tanto, es teóricamente ilimitado el número de *loci* a escrutinio en un sola población. A la estabilidad experimental que demuestra su empleo en diferentes progenitores/cultivares, cruza y poblaciones (como las F_2 y *RIL* aquí analizadas) se añade la particular abundancia, distribución y conservación de generación a generación de las secuencias microsátélites (y flancos), así como la facilidad de manejo, pues son marcadores amplificados vía reacción en cadena de la polimerasa.

Técnica sumamente efectiva bajo condiciones estandarizadas en tanto se realicen los ajustes necesarios de los parámetros experimentales (concentración, tiempo y temperatura) para incrementar especificidad y rendimiento, la reacción en cadena de la polimerasa es una poderosa herramienta de la que se vale el investigador para el análisis de *loci* microsátélites.

Los estudios experimentales llevados a efecto en el presente trabajo demuestran la viabilidad y examinación de los microsátélites como marcadores moleculares de forma rápida y eficaz. No requieren métodos tan elaborados como otros —marcadores RFLPs—, ni exigen costos de aplicación enormes —salvo los de desarrollo—. No solicitan grandes cantidades de ADN genómico y pueden utilizarse sistemas de detección poco complejos. Única limitante para este tipo de análisis molecular es el requerir información de secuencia para la síntesis de iniciadores, misma que puede obviarse de efectuar consultas en datos de bases públicas u otros procedimientos alternos.

El estudio sobre la diversidad genética de maíz tropical y subtropical indica que el análisis con marcadores microsátélites puede usarse para agrupar líneas por los análisis de conglomerados o de componentes principales. Este último, por presentar los datos en forma más detallada y distribuirles en función de la varianza, resultó ser más informativo. Los agrupamientos se infirieron, usualmente, de información previa de linaje, relaciones con otros estudios de variación genética intraccesión, y orígenes del germoplasma.

Ostinato rigore, lo presentado y considerado en este estudio no fue capaz de distinguir grupos realmente verificables dentro de los parámetros que rigen las investigaciones de diversidad genética por marcadores moleculares. Es obligado evaluar un número mucho mayor de accesiones o líneas de diferentes megaambientes, en distintas localidades geográficas y con variadas condiciones experimentales; utilizar un enorme número de marcadores microsátélite, en combinación con otras metodologías moleculares (tales como RFLPs y AFLPs), integrados los datos mediante interfases computacionales diseñadas *ex profeso*, y en correlación con datos morfoagronómicos. Asimismo, sería deseable incluir otras accesiones de interés (compuestos o poblaciones no clasificadas o documentadas en bases de datos), o estudiar variaciones genéticas o patrones de heterosis entre subgrupos intraraciales para la elección de líneas o cultivares como apoyo para en el fitomejoramiento. Consecuentemente, sólo es informativo de manera cualitativa: un ejemplo explorativo de las amplias posibilidades que tienen los marcadores microsátélites *per se* como herramientas aplicadas a problemas agronómicos.

Ergo, debe ponderarse esta investigación sólo como una ilustrativa experiencia formativa de los conocimientos, metodología y lineamientos, así como las complejidades teóricas y prácticas que involucran los estudios cartográficos y los análisis de diversidad genética, o cualesquiera de este tenor científico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A, Fujimura T (1996) Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1071-1077.
- Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A, Fujimura T (1997) Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. *Theor. Appl. Genet.* 94: 61-67.
- Akkaya MS, Bhagwat AA, Cregan PB (1992) Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132: 1131-1139.
- Allard RW (1960) Principles of plant breeding. John Wiley & Sons. 1a Edición EUA. 485 pp.
- Arnold ML, Buckner CM, Robinson JJ (1991) Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1398-1402.
- Asins MJ, Carbonell EA (1986) A comparative study on variability and phylogeny of *Triticum* species. *Theor. Appl. Genet.* 72: 551-558.
- Baldino F Jr., Chesselet M-F, Lewis ME (1989) High-resolution *in situ* hybridization histochemistry. *Meth. Enzymol.* 168: 761-777.
- Beadle GW (1932) The relation of crossing over to chromosome association in *Zea-Euchlaena* hybrids. *Genetics* 17: 481-501.
- Beavis WD, Grant D (1991) A linkage map based on information from four F₂ populations of maize (*Zea mays* L.) *Theor. Appl. Genet.* 82: 636-644.
- Beckmann JS, Soller M (1983) Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theor. Appl. Genet.* 67: 35-43.
- Beckmann JS, Soller M (1990) Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Bio/Technology.* 8: 939-932.
- Bell GI, Torney DC (1993) Repetitive DNA sequences: some considerations for simple sequence repeats. *Computers Chem.* 17: 185-1993.
- Bird RMcK, Goodman MM (1978) The races of maize V: Grouping maize races on the basis of ear morphology. *Econ. Bot.* 31: 471-481.
- Bird RMcK, González-de-León D, Hoisington DA (1997) SSR fingerprints of CIMMYT and other inbred lines. *Maize Genet. Coop. Newsletter* 71: 62-63.
- Brandolini A (1968) European races of corn. *Ann. Corn Sorghum Res. Conf. Proc.* 24: 36-48.
- Breslauer KJ, Frank R, Blocker H, Markey LA (1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 3743-3750.
- Britten RJ, Kohne DE (1968) . Repeated sequences in DNA. *Science* 161: 529.
- Brown SM, Hopkins MS, Mitchell SE, Senior ML, Wang TY, Duncan RR, González-Candelas F, Kresovitch S (1996) Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Theor. Appl. Genet.* 93: 190-198.

- Brown WL, Goodman MM (1977) Races of Corn. En: Corn and Corn Improvement. Sprague G.F. (ed.) American Society of Agronomy. EUA. 2a Reimpresión. p 49-88.
- Browne DL, Litt M (1992) Characterization of (CA)_n microsatellites with degenerate sequencing primers. *Nucl. Acids Res.* 20: 141.
- Burr B, Burr FA, Thompson KH, Albertsen MC, Stuber CW (1988) Gene mapping with recombinant inbreds in maize. *Genetics* 118: 519-526.
- Burr B, Burr FA (1991) Recombinant inbreds for molecular mapping in maize. *Trends Genet.* 7: 55-60.
- Burr B (1994) Some concepts and new methods for molecular mapping in plants. En: DNA-Based Markers in Plants. Phillips RL, Vasil IK (eds.). Kluwer Academic Press. Holanda. 1a Edición. p 1-7.
- Carlson JE, Tulsieram LK, Glaubitz JC, Luk VWK, Kauffeldt C, Rutledge R (1991) Segregation of random amplified DNA markers in F₁ progeny of conifers. *Theor. Appl. Genet.* 83: 194-200.
- Castillo-González F (1994) Aprovechamiento de la diversidad genética del maíz en México. XI Congreso Latinoamericano de Genética (Área Vegetal) y XV Congreso de Fitogenética. Monterrey, Nuevo León, México. Septiembre 25-30.
- Chen X, Temnykh, Xu Y, Cho YG, McCouch SR (1997) Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa*, L.) *Theor. Appl. Genet.* 95: 553-567.
- Cohen JL, Galinat WC (1984) Potential use of alien germplasm for maize improvement. *Crop Sci.* 24: 1011-1015.
- Collins GN, Kempton JH (1920) Heritable characters of maize. I. Lineate stripe. *J. Hered.* 11: 3-6.
- Condit R, Hubbell SP (1991) Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34: 66-71.
- Cooney CA, Matthews HR (1984) The isolation of satellite DNA by density gradient centrifugation. En: Methods in Molecular Biology. Tomo 2: "Nucleic Acids". Walker JM (ed.). The Humana Press. EUA. p 21-29.
- Cornall RJ, Aitman TJ, Hearne CM, Todd JA (1991) The generation of a library of PCR-analyzed microsatellite variants for genetic mapping of the mouse genome. *Genomics* 10: 874-881.
- Crawford DJ (1990) Electrophoresis of seed storage seeds. En: Plant molecular systematics: macromolecular approaches. John Wiley & Sons. EUA. p 30-50.
- Cregan PB (1992) Simple Sequence Repeat DNA Length Polymorphisms. *Probe.* Spring 18-22.
- Creighton HB, McClintock B (1931) A correlation of cytological and genetical crossing over in *Zea mays*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 17: 492-497.

- Curtis H (1986) *Biología*. Editorial Médica Panamericana. 4a Edición. México. 1255 pp.
- Dallas JF (1988) Detection of DNA 'fingerprints' of cultivated rice by hybridization with a human minisatellite DNA probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6831-6835.
- Darnell J, Lodish H, Baltimore D (1990) *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books. 2a Edición. EUA. 1105 pp.
- Dietrich W, Katz H, Lincoln SE, Shin HS, Friedman J, Dracopoli NC, Lander ES (1992) A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics* 131: 423-447.
- Doebley JF (1990a) Molecular systematics of *Zea* (Gramineae). *Maydica* 35: 143-150.
- Doebley JF (1990b) Molecular evidence and evolution of maize. *Econ. Bot.* 44 (2), 6-27.
- Doebley JF, Renfroe W, Blanton A (1984) Restriction site variation in the *Zea* chloroplast genome. *Genetics* 117: 139-147.
- Doebley JF, Goodman MM, Stuber CW (1987) Patterns of isozyme variation between maize and Mexican annual teosinte. *Econ. Bot.* 41 (2): 234-246.
- Doebley JF, Stec A (1993) Inheritance of the morphological differences between maize and teosinte: Comparison of results for two F₂ populations. *Genetics* 134: 559-570.
- Doring HP, Starlinger P (1984) Barbara McClintock's controlling elements. Now at the DNA level. *Cell* 39: 253-259.
- Dudley JW (1993) Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. *Crop. Sci.* 33: 660-667.
- East EM, Hayes HK (1911) Inheritance in maize. *Conn. Agr. Expt. Sta. Bull.* 167.
- Echt CS, Erdahl LA, McCoy TJ (1992) Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. *Genome* 35: 84-87.
- Edwards MD, Stuber CW, Wendel JF (1987) Molecular marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. I. Numbers, distribution, and types of gene action. *Genetics* 116: 113-125.
- Emerson RA, East EM (1913) The inheritance of quantitative characters in maize. *Nebr. Agr. Expt. Sta. Res. Bull.* 2
- Everitt B (1980) *Cluster Analysis*. Gower Publishing Company Limited. Reino Unido. Segunda edición. 136 pp.
- Evola SV, Burr FA, Burr B (1986) The suitability of restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in maize. *Theor. Appl. Genet.* 71: 765-771.
- Falconer DS (1960) *Introduction to quantitative genetics*. Ronald Press Co. EUA.
- Frei OM, Stuber CW, Goodman MM (1986) Use of allozymes as genetic markers for predicting performance in maize single cross hybrids. *Crop Sci.* 26: 37-42.

- Freier SM, Kierzek R, Jaeger JA, Sugimoto N, Caruthers MH, Neilson T, Turner DH (1986) Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83: 9373-9377.
- Gelfand DH (1989) *Taq* DNA polimerase. En: PCR Technology—Principles and Applications for DNA amplification. Erlich HA (ed.). Stockton Press. EUA. 1a Edición. p 17-22.
- Gepts P (1994) Análisis moleculares del proceso de domesticación en plantas: El ejemplo del frijol común (*Phaseolus vulgaris*), En: XI Congreso Latinoamericano de Genética (Área Vegetal) y XV Congreso de Fitogenética. p 4-28.
- Goloubinoff P, Pääbo S, Wilson AC (1993) Evolution of maize inferred from sequence diversity of an *Adh2* gene segment from archaeological specimens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1997-2001.
- González-de-León D, Hoisington DA, Deutsch J, Jewell D, Mihm J (1989) Genetic evaluation of inbred tropical maize germplasm using RFLPs. *Agronomy abstracts*. Annual meetings, Las Vegas, Nevada, Oct. 15-20, 1989.
- González-de-León D, Hoisington DA, Hu X, Jiang C, Khairallah MM (1995) Molecular Marker Applications to Plant Breeding. Curso-taller. CIMMYT.: CIMMYT.
- Goodman MM, Stuber CW, Newton K, Weissinger HH (1980) Linkage relationships of 19 enzyme *loci* in maize. *Genetics* 96: 697-710.
- Goodman MM (1988) The history and evolution of maize. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 7(3): 197-220.
- Griffiths AJ, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM (1996) An Introduction to Genetic Analysis. WH Freeman and Company. EUA. 6a Edición. 915 pp.
- Groh S, González-de-León D, Khairallah MM, Jiang C, Bergvinson D, Bohn M, Hoisington DA, Melchinger AE (en prensa) QTL mapping in tropical maize: III. Genomic regions for resistance to *Diatraea* spp. and associated traits in two *RIL* populations. *Crop Sci*.
- Haldane JBS (1919) The combination of linkage values, and the calculation of distances between the *loci* of linked factors. *J. Genet.* 8: 299-309.
- Haldane JBS, Waddington C (1931) Inbreeding and linkage. *Genetics* 16: 357-374.
- Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T (1982) A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6465-6469.
- Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T, Seidman M, Stollar BD (1984) Characterization of genomic poly(dT-dG)-poly(dC-dA) sequences: structure, organization and conformation. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2610-2621.
- Hanson WD (1959) Minimum family sizes for the planning of genetic experiments. *Agron. J.* 51: 711-715.

- Hayes HK, Immer FR (1942) *Methods of plant breeding*. McGraw-Hill Book Co. EUA. 432 pp.
- Helentjaris T, King G, Slocum M, Siedenstrang C, Wegman S (1985) Restriction fragment length polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 109-118.
- Helentjaris T, Slocum M, Wright S, Schaefer A, Nienhuis J (1986) Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 72: 761-769.
- Helentjaris T (1987) A genetic linkage map for maize based on RFLPs. *Trends Genet.* 3: 217-221.
- Helentjaris T, Weber D, Wright S (1988) Identification of the genomic locations of duplicate nucleotide sequences in maize by analysis of restriction fragment length polymorphisms. *Genetics* 118: 353-363.
- Helentjaris T, Fincher R (1996) Description of a corn genome project at Pioneer Hi-Bred. *Maize Genet. Coop. NewsLetter* 70: 31.
- Higuchi R (1989) Simple and rapid preparation of samples for PCR. En: *PCR Technology—Principles and Applications for DNA Amplification*. Erlich HA (ed.). Stockton Press. EUA. 1a Edición. p 31-38.
- Hoisington DA (1989) Working linkage maps. *Maize Genet. Coop. NewsLetter* 63: 141-151.
- Hoisington DA, Coe EH, Gardiner JM, Melia-Hancock, Grogan RG (1989) Integrative mapping in maize using RFLPs. *Agronomy abstracts*. Annual meetings, Las Vegas, Nevada, Oct. 15-20, 1989.
- Hoisington DA, González-de-León D (1993) HyperMapData —A HyperCard stack for entry and analysis of molecular genetic segregation data. *Agronomy abstracts*. Annual meetings, Cincinnati, Ohio, Nov. 7-12, 1993.
- Hoisington DA, González-de-León D, Khairallah M (1994) *Protocolos de Laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT*. Segunda Edición. México.: CIMMYT.
- Hoisington DA, Jiang C, Khairallah MM, Ribaut J-M, Bohn M, Willcox M, González-de-León D (1996) Prospects for marker assisted selection of complex traits in maize. *Votr. Pflanzenzüchtg.* 33: 50-56.
- Huen M, Kennedy AE, Anderson JA, Lapitan NLV, Sorrels ME, Tanksley SD (1991) Construction of a restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 34: 437-447.
- Hulbert SH, Richter TE, Axtell JD, Bennetzen JL (1990) Genetic mapping and characterization of sorghum and related crops by means of maize DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4251-4255.

Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MAD (1988) DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9436-9440.

IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1977) Nomenclature of multiple forms of enzymes. *J. Biol. Chem.* 252: 5939.

Jacob HJ, Lindpaintner K, Lincoln S, Kusumi K, Bunker RK, Mao YP, Ganten D, Dzau VJ, Lander ES (1991) Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone hypertensive rat. *Cell* 67: 213-224.

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985a) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985b) Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 314: 76-79.

Jeffreys AJ (1987) Highly variable minisatellites and DNA fingerprints. *Biochem. Soc. Trans.* 15: 309-317.

Jeffreys AJ, Wilson J, Neumann R, Keyte J (1988) Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucl. Acids Res.* 16: 10953-10972.

Johnson PH, Grossman LI (1977) Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single-stranded DNAs. *Biochem.* 16: 4217.

Kahler AL, Lay CL (1985) Genetics of electrophoretic variants in the annual sunflower. *J. Hered.* 76: 335-340.

Kato YTA (1984) Chromosome morphology and the origin of maize and its races. *Evol. Biol.* 17: 219-253.

Khairallah MM, Bohn M, Jiang C, Deutsch JA, Jewell DC, Mihm JA, Melchinger AE, González-de-León D, Hoisington DA (en prensa) Molecular mapping of QTL for southwestern corn borer resistance, plant height and flowering in tropical maize. *Plant Breed.*

Kijas JMH, Fowler JCS, Thomas MR (1995) An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. *Genome* 38: 349-355.

Kit S (1961) Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues. *J. Mol. Biol.* 3: 711.

Klein-Lankhorst RM, Vermunt A, Weide R, Liharska T, Zabel P (1991) Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.* 83: 108-114.

Knapp SJ (1994) Mapping quantitative trait loci. En: DNA-Based Markers in Plants. Phillips RL, Vasil IK (eds.). Kluwer Academic Press. Holanda. 1a Edición. p 58-96.

- Kochert G (1989) Introduction to RFLP mapping and plant breeding applications. Rockefeller Foundation.
- Kochert G (1994) RFLP technology. En: DNA-Based Markers in Plants. Phillips RL, Vasil IK (eds.). Kluwer Academic Press. Holanda. 1a Edición. p 8-38.
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eugen.* 12: 172-175.
- Krzanowski WJ (1988) Principles of Multivariate Analysis: A user's perspective. Oxford University Press. Irlanda del Norte. 1a Edición. 563 pp.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L (1987) MAPMAKER: An interactive computer program for constructing genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Lander ES, Botstein D (1989) Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.
- Langercrantz U, Ellegren H, Andersson L (1993) The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucl. Acids Res.* 21: 1111-1115.
- Landry BS, Kesseli RV, Farrarra B, Michelmore RW (1987) A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Genetics* 116: 331-337.
- Lee SJ, Penner GA, Devos KM (1995) Characterization of loci containing microsatellite sequences among Canadian wheat cultivars. *Genome* 38: 1037-1040.
- Levinson G, Gutman GA (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 4: 203-221.
- Litt M, Luty JA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Gen.* 44: 397-401.
- Lorieux M (1994) Aspects statistiques de la cartographie des marqueurs moléculaires. Document de travail de la mission biométrie N°1-94, Centre de la Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD). 49pp.
- Ma ZQ, Röder M, Sorrells M (1996) Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetra-nucleotide microsatellites in wheat. *Genome* 39: 123-1130.
- Markert CL, Moller F (1959) Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species-specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45: 753.
- McClintock B (1929) Chromosome morphology in *Zea mays*. *Science* 69: 629.
- McClintock B (1931) Cytological observations of deficiencies involving known genes, translocations and an inversion in *Zea mays*. *Miss. Agric. Exp. Stn. Res. Bull.* 163: 1-30.
- McClintock B (1932) A correlation of ring-shaped chromosomes with variegation in *Zea mays*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 18: 677-681.

- McClintock B (1978) Significance of chromosome constitutions in tracing the origin and migration of races of maize in the Americas. En: *Maize Breeding and Genetics*. Walden DB (ed.). John Wiley and Sons. EUA. p 159-184.
- McClintock B, Kato YTA, Blumenschein A (1981) Chromosome constitution of races of maize. Colegio de Postgraduados, México. 505 pp.
- McCouch SR, Chen X, Panaud O, Temnykh S, Xu Y, Cho YG, Huang N, Ishii T, Blair M (1997) Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol. Biol.* 35: 89-99.
- McLean SD, Vasal SK, Pandey S, Srinivasan G (1997) The use of testers to exploit heterosis in tropical maize at CIMMYT. En: CIMMYT. 1997. *Book of Abstracts*. The genetics and exploitation of heterosis in crops; an international symposium. México, D.F. México: CIMMYT. p 26-27.
- Mladenovic-Drinic S, Konstantinov K (1997) Genetic diversity for molecular markers and prediction of heterosis in maize. En: CIMMYT. 1997. *Book of Abstracts*. The genetics and exploitation of heterosis in crops; an international symposium. México, D.F. México. p 94-95.
- Montarras D, Pinset C, Chelly J, Kahn A (1994) RT-PCR and gene expression. En: *The Polymerase Chain Reaction*. Mullis KB, Ferré F, Gibbs RA (eds.) Birkhauser. EUA. p 277-293.
- Monte JV, McIntyre CL, Gustafson JP (1993) Analysis of phylogenetic relationships in the Triticeae tribe using RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 86: 649-655.
- Morgan TH (1910) Chromosomes and heredity. *Amer. Nat.* 44: 449.
- Morgante M, Olivieri AM (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3: 175-182.
- Morton N (1955) Sequential tests for the detection of linkage. *Am.J.Hum.Genet.* 7: 277-318.
- Mullis KB, Faloona F (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155: 335-350.
- Mullis KB (1989) The Polymerase Chain Reaction: Why it works. En: *Polymerase Chain Reaction*. Erlich HA, Gibbs R, Kazazian Jr HH (eds.) Current Communications in Molecular Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press. p 237-243.
- Mullis KB (1990) The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, Abril 56: 36-43.
- Murigneux A, Barloy D, Leroy P, Beckert M (1993) Molecular and morphological evaluation of doubled haploid lines in maize. 1. Homogeneity within DH lines. *Theor. Appl. Genet.* 86: 837-842.
- Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolf R, Holm T, Culver M, Martin C, Fugimoto E, Hoff M, Kumlin E, White R (1987) Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235: 1616-1622.

- Nelson LS, Johnson GN, Crawford ML, Nance WL, Nelson CD, Doudrick RL (1992): An automated approach to genetic mapping with randomly amplified polymorphic DNA markers. *Plant Genome I Abstracts*: 39.
- Newton CR, Holland D, Heptinstall LE, Hogson I, Edge MD, Markham AF, McLean M (1993) *Nucl. Acids Res.* 21: 1155
- Newton CR, Graham A (1995) PCR. Bios-Scientific Publishers. Reino Unido. 1a Edición. 162 pp.
- Nybom H (1990) Genetic variation in ornamental apple trees and their seedlings (*Malus*, Rosaceae) revealed by DNA fingerprinting with the M13 repeat probe. *Hereditas* 113: 17-28.
- Nybom H, Rogstad SH, Schaal BA (1990) Genetic variation detected by the use of the M13 DNA fingerprint probe in *Malus*, *Prunus*, and *Rubus* (Rosaceae). *Theor. Appl. Genet.* 79: 153-156.
- Nordheim A, Rich A (1983) The sequence (dC-dA)_n, (dT-dG)_n forms left handed Z-DNA in negatively supercoiled plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 1821-1825.
- Orita M, Susuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874-879.
- Oste C (1989) PCR Automation. En: PCR Technology—Principles and Applications for DNA amplification. Erlich HA (ed.). Stockton Press. EUA. 1a Edición. p 23-30.
- Paran I, Michelmore RW (1993) Sequence characterized amplified regions (SCARs) as a codominant genetic marker in *Lactuca* spp. *Theor. Appl. Genet.* 85: 985-993.
- Phelps TL, Hall AE, Buckner B (1996) Microsatellite repeat variation within the *y1* gene of maize and teosinte. *J. Hered.* 87(5): 396-399.
- Plaschke J, Ganai MW, Röder MS (1995) Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 91: 1001-1007.
- Powell W, Machray GC, Provan J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1: 215-221.
- Provan J, Powell W, Waugh R (1996) Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*) *Theor. Appl. Genet.* 92: 1078-1084.
- Quiros CF, Hu J, This P, Chevre AM, Delseny M (1991) Development and chromosomal localization of genome-specific markers by polymerase chain reaction in Brassica. *Theor. Appl. Genet.* 82: 627-632.
- Rafalski JA, Tingey SV (1993) Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.* 9: 275-280.
- Reiter RS, Williams J, Feldman KA, Rafalski JA, Tingey SV, Skolnick PA (1992) Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplification polymorphic DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 1477-1481.

- Rhoades MM (1936) A cytogenetical study of a chromosome fragment in maize. *Genetics* 21: 491-502.
- Ribaut J-M, Hoisington DA, Deutsch JA, Jiang C, González-de-León D (1996) Identification of quantitative trait *loci* under drought conditions in tropical maize. 1. Flowering parameters and the anthesis-silking interval. *Theor. Appl. Genet.* 92: 905-914.
- Ribaut J-M, Hu X, Hoisington DA, González-de-León D (1997) Use of STSs and SSRs as rapid and reliable preselection tools in a marker-assisted selection backcross scheme. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15(2): 154-162.
- Richardson T, Cato S, Ramser J, Kahl G, Weising K (1995) Hybridization of microsatellites to RAPD: a new source of polymorphic markers. *Nucl. Acids Res.* 23: 3798-3799.
- Richlik W, Spencer WJ y Rhoades RE (1990) Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucl. Ac. Res.* 18: 6409-6412.
- Rieger R, Michaelis A, Green MM (1976) Glossary of Genetics and Cytogenetics. Springer-Verlag. República Democrática Alemana. 4a Edición. 647 pp.
- Röder MS, Plaschke J, König SU, Börner A, Sorrells ME, Tanksley SD, Ganai MW (1995) Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* 246: 327-333.
- Rogstad SH, Patton JC II, Schaal BA (1988) M13 repeat probe detects DNA minisatellite-like sequences in gymnosperms and angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 9176-9178.
- Rogstad SH, Wolff K, Schaal BA (1991) Geographical variation in *Asimina triloba* Dunal (*Annonaceae*) revealed by the M13 DNA fingerprinting probe. *Am. J. Bot.* 78: 1391-1396.
- Saghai-Maroo MA, Soliman K, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 8014-8018.
- Saghai-Maroo MA, Bitashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5466-5470.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Saiki RK (1989a). Optimization of the Polymerase Chain Reaction. En: Polymerase Chain Reaction. Erlich HA, Gibbs R, Kazazian Jr HH (eds.) *Current Communications in Molecular Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. EUA. p 25-30.

- Saiki RK (1989b) The Design and Optimization of the PCR. En: PCR Technology-Principles and Applications for DNA Amplification. Erlich HA (ed.). Stockton Press. EUA. 1a Edición. p 7-16.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning —A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Tomo 1. 2a Edición. Nueva York, E.U.A. p 6.3-6.62.
- Santillán-Torres JL, Ponce-Noyola P (1993) A novel stain for DNA in agarose gels. *Trends Genet.* 9: 40.
- Sanguinetti CJ, Dias E, Simpson AJG (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17: 915-921.
- Sax K (1923) The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8:552-560.
- Senior ML, Heun M (1993) Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome* 36: 884-889.
- Senior ML, Chin E, Smith S (1995) Simple Sequence Repeats in maize —a progress report. *Maize Genet. Coop. Newsletter* 69: 119, 120.
- Senior ML, Chin ECL, Lee M, Smith JSC, Stuber CW (1996) Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the Genbank database: Map construction. *Crop Sci.* 36: 1676-1683.
- Serikawa T, Kuramoto T, Hilbert P, Mori M, Yamada J, Dubay CJ, Lindpainter K, Ganten D, Guénet JL, Lathrop GM, Beckmann JS (1992) Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics* 131: 701-721.
- Shattuck-Eidens DM, Bell RN, Neuhausen SL, Helentjaris T (1990) DNA sequence variation within maize and melon: observations from polymerase chain reaction amplification and direct sequencing. *Genetics* 126: 207-217.
- Sharp PJ, Chao S, Desai S, Gale MD (1989) The isolation, characterization and application in the Triticeae of a set of wheat RFLP probes identifying each homoeologous chromosome arm. *Theor. Appl. Genet.* 78: 342-348
- Singh L, Purdom IF, Jones KW (1980) Sex chromosome-associated satellite DNA evolution and conservation. *Chromosoma* 79: 137-157.
- Smith JSC, Goodman MM, Stuber CW (1984) Variation within teosinte. III. Numerical analysis of allozyme data. *Econ. Bot.* 38 (1): 97-113.
- Smith JSC, Goodman MM, Stuber CW (1985) Relationships between maize and teosinte of Mexico and Guatemala: Numerical analysis of allozyme data. *Econ. Bot.* 39: 12-24.
- Smith JSC, Chin ACL, Shu H, Smith OS, Wall SJ, Senior ML, Mitchell SE, Kresovich S, Ziegler J (1997) An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays*, L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 95: 163-173.

- Sobral BWS, Honeycutt RJ (1993) High output genetic mapping in polyploids using PCR-generated markers. *Theor. Appl. Genet.* 86: 105-112.
- Sobral BWS, Honeycutt RJ (1994) Genetics, plants and the polymerase chain reaction. En: The polymerase chain reaction. Mullis KB, Ferré F y Gibbs RA (eds.) Birkhäuser. EUA. p 305-319.
- Soller M, Brody T (1976) On the power of experimental designs for the detection of linkage between inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* 47:35-39.
- Stalling RL, Ford AF, Nelson D, Torney DC, Hildebrand CE, Mayzis RK (1991) Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* 10: 807-815.
- Strickberger MW (1976) Genetics. Macmillan Publishing, Co. EUA. 2a Edición. p 145-160.
- Stuber CW (1992) Biochemical and Molecular Markers in Plant Breeding. *Plant Breed. Rev.* 9: 37-61.
- Suekoa N (1961) Variation and heterogeneity of base composition of deoxyribonucleic acids: A compilation of old and new data. *J. Mol. Biol.* 3: 31.
- Taba S, Pineda F, Crossa J (1994) Forming Core Subsets from the Tuxpeño Race Complex. En: CIMMYT 1994. The CIMMYT Maize Germplasm Bank: Genetic Resource Preservation, Regeneration, Maintenance, and Use. Maize Program Special Report. Taba S (ed.). Mexico, D.F. p 60-84.
- Taba S (1995) Maize germplasm: Its spread, use, and strategies for conservation. En: Maize Genetic Resources. Maize Program Special Report. Taba S (ed.). Mexico, D.F.: CIMMYT. p 7-31.
- Tadmor Y, Katzir N, Juvik J, Bar-Zur A (1995) Mapping of RAPD markers linked to chromosomal regions affecting sugar accumulation in *sugary enhancer sweet corn*. *Theor. Appl. Genet.* 91: 489-494.
- Tanksley SD, Medina-Filho H, Rick CM (1982) Use of naturally-occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. *Heredity* 49:11-25.
- Tanksley SD (1983) Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biol. Rep.* 1:3-8.
- Tanksley SD, Hewitt J (1988) Use of molecular markers in breeding for soluble solids content in tomato: a re-examination. *Theor. Appl. Genet.* 75: 811-823.
- Tanksley SD, Young ND, Patterson AH, Bonierbale MW (1989) RFLP in plant breeding: New tools for an old science. *Bio/Technology.* 7: 257-264.
- Taramino G, Tingey S (1996) Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome* 39: 277-287.
- Taramino G, Tarchini R, Ferrario S, Lee M, Pe ME (1997) Characterization and mapping of simple sequence repeats (SSRs) in *Sorghum bicolor*. *Theor. Appl. Genet.* 95: 66-72.

- Tautz D, Renz M (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucl. Acids Res.* 12: 4127-4138.
- Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Acids Res.* 17: 6463-6471.
- Thomas MR, Scott NS (1993) Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.* 86: 985-990.
- Tingey SV, del Tufo JP (1993) Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiol.* 101: 349-352.
- Tippens PE (1988) Física —Conceptos y Aplicaciones. Editorial McGraw-Hill/Interamericana. México. 2a Edición. p 725-727.
- Tsegaye S, Tesemma T, Belay G (1996) Relationships among tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) landrace populations revealed by isozyme markers and agronomic traits. *Theor. Appl. Genet.* 93: 600-605.
- Vassart G, Georges M, Monsier M, Brocas H, Lequarre AS, Christophe D (1987) A sequence in M13 detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science* 235: 683-684.
- Vahala T, Eriksson T, Engstrom P (1991) Genetic variability in basket willow (*Salix viminalis*) detected by hybridization to a bacteriophage-M13 DNA probe. *Hereditas* 115: 153-161.
- Vergnaud G (1989) Polymers of random short oligonucleotides detect polymorphic loci in the human genome. *Nucl. Acids Res.* 17: 7623-7630.
- Vladutiu AO, Vladutiu GD (1991) Isoenzymes. En: Encyclopedia of Human Biology. Dulbecco R (ed.). Academic Press. EUA. Vol.4: 573-580.
- Voet D, Voet JG (1990) Biochemistry. John Wiley & Sons. 1a Edición EUA. 1223 pp.
- Wang ZY, Tanksley SD (1989) Restriction fragment length polymorphism in *Oryza sativa* L. *Genome* 32: 1113-1118.
- Wang Z, Weber JL, Zhong G, Tanksley SD (1994) Survey of plant short tandem repeats. *Theor. Appl. Genet.* 88: 1-6.
- Wanous MK, Snape JW, Gustafson JP (1997) Factors influencing efficiency of genetic mapping projects. *Maize Genet. Coop. Newsletter* 71: 28, 29.
- Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM (1987) Molecular Biology of the Gene. 4ª Edición. The Benjamin Cummins Publishing Company, Inc. Nueva York, EUA. 1163 pp.
- Weber JL, May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 388-396.
- Weber JL (1990) Informativeness of human (dC-dA)_n-(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* 7: 524-530.

- Weising K, Weigand F, Driesel A, Kahl G, Zischler H, Epplen JT (1989) Polymorphic GATA/GACA repeats in plant genomes. *Nucl. Acids Res.* 17: 10128.
- Weissenbach J, Gyapay G, Dib G, Vignal A, Morrisette J, Millasseau P, Vaysseix G, Lanthrop M (1992) A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 359: 794-801.
- Wellhausen EJ, Roberts LM, Hernández-Xolocotzi E, Mangelsdorf PC (1951) Razas del maíz en México. México. Oficina de Estudios Especiales, Secretaría de Agricultura y Ganadería. Folleto Técnico No.5. 237 pp.
- Wellhausen EJ (1988) The indigenous maize germplasm complexes of Mexico: Twenty-five years of experience and accomplishments in their identification, evaluation, and utilization. En: Recent Advances in the conservation and utilization of genetic resources: Proceedings of the global maize workshop, p 17-28. México D.F.: CIMMYT.
- Welsh JR (1981) Fundamentals of Plant Genetics and Plant Breeding. John Wiley & Sons. EUA. 1a Edición. 290 pp.
- Welsh J, McClelland M (1990a) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18: 7213-7218.
- Welsh J, McClelland M (1990b) Genomic fingerprints produced by PCR with consensus tRNA gene primers. *Nucl. Acids Res.* 19: 1-6.
- Welsh J, Honeycutt RJ, McClelland M, Sobral BWS (1991) Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theor. Appl. Genet.* 82: 473-476.
- Wendel JF, Stuber CW, Edwards MD, Goodman MM (1986) Duplicated chromosome segments in maize (*Zea mays*, L.): Further evidence from hexokinase isozymes. *Theor. Appl. Genet.* 72:178-185.
- White TJ (1996) The future of PCR technology: diversification of technologies and applications. *Trends Biotech.* 14 (12): 478-483.
- Wilkes HG (1967) Teosinte: The closest relative of maize. EUA. The Bussey Institute, Harvard University.
- Wilkinson L (1989) SYSTAT: The System for Statistics. EUA. SYSTAT, Inc.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Williams MNV, Pande N, Nair S, Mohan M, Bennett J (1991) Restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction products amplified from mapped loci of rice (*Oryza sativa* L.) genomic DNA. *Theor. Appl. Genet.* 82:489-498.
- Wolfe KH, Sharp PM, Li WH (1989) Mutation rates among regions of the mammalian genome. *Nature* 337: 283-285.

Wu KS, Tanksley SD (1993) Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol. Gen. Genet.* 241: 225-235.

Zhao X, Kochert G (1993) Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)_n microsatellite from rice (*Oryza sativa*, L.). *Plant Mol. Biol. Rep.* 21: 607-614.

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

Zimmerman PA, Langunnasch N, Cullis CA (1989) Polymorphic regions in plant genomes detected by an M13 probe. *Genome* 32: 824-828.

ANEXO

A continuación se describen pormenorizadamente las concentraciones de los reactivos y las características de cada uno de los aparatos utilizados en el trabajo experimental. Las compañías y casas comerciales que les elaboran y/o manufacturan se mencionan de manera adjunta.

REACTIVOS

- ⊙ Polimerasa *Taq* del ADN, 500 U (5U/ μ L) GIBCO BRL[®] Life Technologies[®], Inc.
- ⊙ Desoxioligonucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 10 mM.
- ⊙ Cloruro de magnesio, 50 mM.
- ⊙ Solución tampón 10x para la polimerasa *Taq* del ADN.
- ⊙ Glicerol 100%, SIGMA[®] Chemical Co.
- ⊙ Agua destilada, SIGMA[®] Chemical Co.
- ⊙ Aceite mineral, SIGMA[®] Chemical Co.
- ⊕ Agarosa, METAPHOR[®], FMC Bioproducts[®]; SEAKEM LE[®], FMC Bioproducts[®]; NUSIEVE[®], FMC Bioproducts[®].
- ⊕ Acrilamida, Grado Electroforesis, GIBCO BRL[®] Life Technologies[®], Inc.
- ⊕ Bis-acrilamida (*N,N'*-MetilenBis-Acrilamida), Grado Electroforesis, GIBCO BRL[®] Life Technologies[®], Inc.
- ⊕ TEMED (*N,N,N',N'*-Tetrametilenenediamina), SIGMA[®] Chemical Co.
- ⊕ Persulfato de amonio, SIGMA[®] Chemical Co.

APARATOS Y EQUIPO

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

- ⊕ Pipetman[®], 2 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 1000 μ L; Gilson Laboratories.
- ⊕ Tubos para PCR de polipropileno; volumen de 0.2 mL; 8 tubos/serie; incoloros, estériles; Robbins Scientific[®], Corp.
- ⊕ Tapas para tubos de PCR de polipropileno; 8 tubos/serie; incoloros, estériles; Robbins Scientific[®], Corp.
- ⊕ Jeringas 1.5 mL, NICHIRYO[®].
- ⊕ Campana de flujo laminar, modelo "Table Top"; Environmental Air Control, Inc.
- ⊕ Máquina termocicladora de PCR, ERICOMP[®] TwinBlock[®] System Easycycler[®] Series.

ELECTROFORESIS

- Tanque y aparato para electroforesis sobre gel de poliacrilamida, modelo BIORAD PROTEAN[®] II xi Cell, BIORAD Laboratories.
- Peines de teflón: 15 dientes, 1.0 mm; 20 dientes, 1.0 mm; 25 dientes, 0.75 mm.
- Separadores: 20 cm x 0.75 mm; 20 cm x 1.0 mm.
- Sistema de electroforesis de tanque horizontal para gel de agarosa, modelo H4, BRL[®] Life Technologies[®], Inc.
- Peines de teflón: 30 dientes, 1.0 mm.
- Fuentes de Poder, FOTODYNE[®] y FisherBiotech[®].
- Película fotográfica, Polaroid[®] 667.
- Cámara fotográfica, FOTODYNE[®] Polaroid[®] MP4 Land Camera.
- Transiluminador de luz UV, FOTODYNE[®].