

36.
7er



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

IDENTIFICACION DE SECUENCIAS POLIMORFICAS
DE ADN EN DOS LINEAS DE MAIZ (*Zea mays* L)
CONTRASTANTES EN LONGEVIDAD

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
PAOLA SIERRA MORON



MEXICO, D. F.



1999

EXAMENES
SECRETARIA

FECHAS
CA

280922

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

Jurado Asignado:

Presidente: Prof. Homero Hernández Montes

Vocal: Prof. Irma Ofelia Bernal Lugo

Secretario: Prof. Mireya Rodríguez Penagos

1er.Suplente: Prof. José Pedraza Chaverri

2do.Suplente: Prof. Francisco Ruiz Terán

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 104. Departamento de Bioquímica. Conjunto E. Facultad de Química.
UNAM.

Asesor del Tema

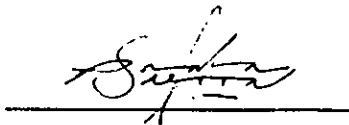
Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Irma Ofelia Bernal Lugo', written over a horizontal line. The signature is stylized and includes a large flourish at the end.

Sustentante

Paola Sierra Morón



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Paola Sierra Morón', written over a horizontal line. The signature is stylized and includes a large flourish at the end.

Agradezco al Subprograma 127 "Formación Básica en la Investigación" por la beca otorgada a mi persona para la realización y conclusión de mi trabajo de tesis.

Mi sincero agradecimiento

A la Dra. Irma Bernal Lugo por brindarme su amistad, su apoyo, sus conocimientos, sus enseñanzas, su paciencia y por haber influido en mi formación como persona, estudiante e investigadora.

A la I.B. Rubí Hernández y al B. Leonel Montoya por su valiosa orientación y apoyo.

Al Dr. Javier Plasencia por su orientación y apoyo técnico.

Al jurado por sus comentarios, correcciones y tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo.

A mis compañeros de laboratorio.

A la Universidad Autónoma de México y a la Facultad de Química por todas las oportunidades y apoyo que me han dado para mi formación profesional.

Este trabajo lo quiero dedicar como agradecimiento a las personas que han influido en lo que soy hasta estos momentos. Primero quisiera agradecer a Dios, por haberme bendecido de tantas formas y mostrarme el camino a seguir. A mis padres, que han sido el ejemplo a seguir y que siempre me han brindado su amor, su apoyo, su confianza y gracias a ellos soy quien soy. Los quiero mucho. A mi hermana Mariana, que aunque no lo crea me ha enseñado muchísimas cosas, la admiro y la quiero mucho, muchas gracias por tu apoyo y cariño. A mi niño Erik, por sus enseñanzas, su confianza, apoyo, amor, y por siempre hacerse presente a pesar de la distancia. A Juan Pablo, que te puedo decir, que no te haya dicho en esos cafes de 5 horas, sabes lo inmesamente agradecida que estoy contigo, cuentas conmigo para toda la vida, ni modo, no te vas a librar de mi. A mis amigas Nuria, Flor y Tere que hicieron la vida en la universidad y las horas de desvelo sumamente divertidas. A mis amigas de años Claudia, Ma. Luisa, Elvia, Gaby, Brenda por lo que hemos pasado juntas y por lo que nos falta todavía. A toda mi familia.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
A. Usos industriales y agronómicos del maíz.	5
B. Envejecimiento.	8
• Cambios asociados con el envejecimiento de la semilla.	11
C. Fitomejoramiento y técnicas de selección.	13
• Técnicas moleculares para la identificación de marcadores moleculares.	15
• Técnica de ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD).	17
3. OBJETIVOS	19
4. MATERIAL Y MÉTODOS	20
A. Materiales biológicos	20
B. Caracterización Fenotípica.	21
C. Caracterización Genotípica.	23
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
A. Caracterización Fenotípica.	25
B. Identificación de secuencias polimórficas.	43
C. Análisis de la estabilidad de las secuencias polimórficas con el Envejecimiento Acelerado.	51
6. CONCLUSIONES	58
7. BIBLIOGRAFÍA	59

8. APÉNDICES	63
Apéndice 1. Materiales Biológicos.	63
Apéndice 2. Caracterización Fenotípica.	65
Apéndice 3. Caracterización Genotípica.	68

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
1. Factores que incrementan la velocidad de deterioro de semillas, debido a que son promotores de la formación de ERO.	10
2. Diagrama de flujo para la caracterización fenotípica.	22
3. Diagrama de flujo para la caracterización genotípica.	24
4. Curvas de viabilidad de tiempo cero de EA	27
5. Curvas de viabilidad de 0, 1, 5 y 10 días de EA a 100 % HR y 40°C	32
6. Curva de sobrevivencia de EL21X a 100 % HR y 40°C	33
7. Curvas de sobrevivencia a 85 % HR y 35°C.	39
8. Gel de ADN al 1.5 % de agarosa. Productos de amplificación de RAPD de algunos oligonucleótidos que no presentaron polimorfismo y que no amplificaron.	46
9. Gel de ADN al 1.5 % de agarosa. Productos de amplificación de RAPD que presentaron polimorfismo utilizando el oligonucleótido H7 (5'-CTGCATCGTG-3').	47
10. Gel de ADN al 1.5 % de agarosa . Productos de amplificación de RAPD que presentaron polimorfismo utilizando el oligonucleótido EX1 (5'-GTGACATAGC-3').	53
11. Gel de ADN al 1.5 % de agarosa. Productos de amplificación de RAPD que presentaron polimorfismo utilizando el oligonucleótido ABA04 (5'-CACGTGACGT-3')	54
12. Gel de ADN al 1.0 % de agarosa. ADN de EL16 y EL17 a diferentes períodos de EA (100% HR / 40°C).	56

ÍNDICE DE CUADROS

	PÁGINA
1. Contenido de humedad inicial de semillas de las semillas de maíz incluidas en este estudio.	25
2. Viabilidad y velocidad de germinación (V_{G50}) de líneas de maíz a cero días de envejecimiento acelerado.	29
3. Viabilidad y velocidad de germinación (V_{G50}) a 0 y 10 días de EA a 100 % HR y 40°C.	34
4. % de Germinación de semillas con EA de 75 % HR y 30°C.	37
5. Valores de P_{50} y clasificación de las líneas de acuerdo a su SE a un EA de 85 % HR y 35°C.	38
6. Clasificación de las líneas de maíz sometidas a 85 % HR y 35°C de acuerdo al período en que su viabilidad permanece constante.	41
7. Nombre y secuencia del extremo 5' al 3' de los oligonucleótidos utilizados. Estos oligonucleótidos están agrupados de acuerdo a los diferentes tipos de estres a los que fueron asociados.	44
8. Clasificación de las 35 secuencias de oligonucleótidos utilizados en los RAPDs de acuerdo al polimorfismo presentado entre EL16 y EL17.	48
9. Clasificación de los RAPDs para las secuencias que no presentaron polimorfismo y de los que presentaron polimorfismo.	49
10. Viabilidad de EL16 y EL17 a 100% HR y 40°C durante 4 y 8 días de envejecimiento.	51
11. Resultados de los RADPs de las secuencias H7, EX1 y ABA04 que presentaron polimorfismo en el control y en los envejecidos entre las líneas EL16 y EL17.	52
12. Nombre y secuencia del extremo 5' al 3' de los oligonucleótidos	63

utilizados. Estos oligonucleótidos están agrupados de acuerdo a los diferentes tipos de estres a los que fueron asociados.

13. Características del amortiguador utilizado para la electroforesis.	71
14. Comparación entre RFLP y RAPDs.	74
15. Concentraciones finales en la mezcla de reacción	74
16. Condiciones utilizadas para los RAPDs.	74
17. Espectro de resolución efectiva de fragmentos de ADN de acuerdo a la concentración de agarosa utilizada.	75

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ABA	Ácido abscísico
ARN	Ácido ribonucleico
CH	Contenido de humedad
EA	Envejecimiento acelerado
EDTA	Ácido etilendinitrilotetracético
ERO	Especies reactivas de oxígeno
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HR	Humedad relativa
KCl	Cloruro de potasio
NaCl	Cloruro de sodio
DO	Densidad óptica
P ₅₀	Período de tiempo en el que el 50 % de la población perdió su viabilidad
PC	Pared celular
pH	Potencial de hidrógeno
QTL	Loci de caracteres cuantitativos (Quantitative Trait Loci)
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar (Random Polymorphic DNA)
RFLP	Polimorfismos en longitud de fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RH	Respuesta hipersensible
SAM	Selección asistida por marcadores
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SE	Sensibilidad al envejecimiento
T	Temperatura
TAE	Tris acetato

TE	Tris-EDTA
t_{G50}	Tiempo en el que germina el 50 % del lote
UV	Ultravioleta
V_{G50}	Velocidad de germinación con que germina el 50 % del lote

IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS POLIMÓRFICAS DE ADN EN DOS LÍNEAS DE MAÍZ (*Zea mays* L) CONTRASTANTES EN LONGEVIDAD.

RESUMEN

Los programas de fitomejoramiento tienen como meta la producción de nuevos y mejorados genotipos. Este objetivo se alcanza gracias a los procesos de recombinación y segregación que ocurren en la progenie de individuos heterocigotos.

Uno de los problemas que dificultan la labor del fitomejorador es la de identificar el fenotipo recombinante deseado de entre la población de segregantes. Para mejorar la eficiencia de selección de los genotipos mejorados, en la actualidad se hace uso de marcadores genéticos. Estos consisten en secuencias específicas de ADN asociadas a una característica de interés y que puede ser rápidamente detectada en la progenie. El proceso para identificar marcadores genéticos involucra varias etapas, una de las cuales es la identificación de secuencias polimórficas en materiales contrastantes para el carácter de interés.

El objetivo del trabajo aquí descrito, fue: seleccionar líneas de maíz contrastantes en su sensibilidad al envejecimiento (SE) y analizar en algunas de ellas, el grado de polimorfismo a nivel de ADN.

El desarrollo del trabajo inició con la clasificación de 13 líneas de maíz basándose en su SE. Los regímenes utilizados para obtener esta clasificación fueron: 100 % HR y 40°C, 85 % HR y 35°C y 75 % HR y 30°C. De las líneas estudiadas, se escogieron dos líneas contrastantes EL16 de baja sensibilidad al envejecimiento (SE) y EL17 de mediana SE. El régimen de 85 % HR y 35°C permitió la mejor generación de curvas de sobrevivencia, por lo que fue utilizado para clasificar las líneas.

Posteriormente, el ADN de estas dos líneas contrastantes se utilizó para realizar RAPDs. De un total de 35 secuencias de oligonucleótidos probados, 22 no presentaron productos de amplificación, 10 presentaron productos de amplificación pero fueron no polimórficos y 3 secuencias presentaron polimorfismo entre EL16 y EL17. Las tres secuencias de oligonucleótidos que presentaron bandas polimórficas entre EL16 y EL17 fueron: H7, EX1 y ABA04. Dado que los RAPDs detectan loci dominantes diríamos que EL16 posee 5 locus que están ausentes de EL17 y que EL17 posee dos locus que no posee EL16.

Finalmente, estas secuencias se probaron con material envejecido de EL16 y de EL17 a 100 % HR y 40°C durante 4 y 8 días de EA. Se observó que el envejecimiento tiene un efecto sobre el ADN debido a la generación de nuevos loci y desaparición de los loci presentes en los controles.

1. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) ha estado vinculado con el desarrollo social y económico de los pueblos desde los albores de las culturas mesoamericanas. En la actualidad, el maíz se cultiva casi en todo el mundo y además de utilizarse como alimento, la gran variedad de usos industriales que se le han dado a la semilla, le confiere una importancia estratégica a nivel mundial.

Al ser el maíz un cultivo de temporada, el almacenamiento y conservación del grano de maíz ha sido uno de los principales problemas que han retado a varias generaciones de productores. En nuestro país este problema se agudiza debido a las altas temperatura (T) y humedad relativa (HR) de nuestras regiones agrícolas que aceleran el proceso de deterioro de las semillas.

El envejecimiento es un proceso natural que implica una serie de cambios físicos y químicos degenerativos que se manifiesta por la pérdida gradual de la viabilidad y el vigor de la semilla hasta que finalmente muere. Este deterioro se refleja en una disminución de la productividad y de la utilización en la industria procesadora de alimentos para consumo humano y pecuario.

Una de las estrategias que permitiría disminuir las pérdidas ocasionadas por el envejecimiento de las semillas en almacén, sería el desarrollar semillas de maíz con mejores características de almacenamiento. Esto se puede lograr a través de un programa de fitomejoramiento.

Sin embargo, el envejecimiento de una semilla es una acumulación de cambios degenerativos que al final conlleva a la muerte celular. Lo más probable es que sea un carácter cuya herencia está determinada por múltiples genes, cada uno de los cuales contribuye en forma aditiva al efecto final. Este tipo de genes son conocidos como Loci de caracteres cuantitativos (QTL). En los caracteres típicamente cuantitativos, influye mucho más el medio ambiente que en los

caracteres cualitativos (Poehlman, 1987), por lo que la selección fenotípica de individuos con las características de almacenamiento deseables resultaría difícil, compleja y larga (Knapp, 1998).

Por lo anterior se prefiere la utilización de la Selección asistida por marcadores (SAM). Los marcadores se emplean para etiquetar los caracteres deseados, es decir, se seleccionan marcadores cercanamente ligados a los genes que controlan el carácter deseado (Gale y Witcombe, 1992). De esta manera, por medio de SAM permite al mejorador relacionar el(los) gene(s) que expresa(n) una parte específica del fenotipo con las distintas regiones en donde se encuentra(n) dicho(s) gene(s) (Lande, 1991; Knapp, 1998). Una vez que el marcador del carácter de interés se establece, su presencia o ausencia en la progenie, permitirá la predicción del tipo de herencia del carácter cuando se realice el fitomejoramiento (Winter y Kahl, 1995).

Una de las técnicas que permiten la identificación de un posible marcador es la llamada RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar), basada en la detección de diferencias o polimorfismos en secuencias de nucleótidos en una reacción que amplifica el ADN. El polimorfismo depende de las variaciones hereditarias; estas variaciones aumentan cuando plantas distintas muestran formas contrastadas de los caracteres de interés.

Para desarrollar estos programas de fitomejoramiento, se requiere contar con poblaciones contrastantes en longevidad, identificar las secuencias polimórficas y luego determinar la cosegregación del fenotipo y el marcador en la descendencia. Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue clasificar diversas líneas de maíz en base a su sensibilidad al envejecimiento y posteriormente la identificación de secuencias polimórficas en dos poblaciones contrastantes en longevidad. Esto constituye, el principio para encontrar un marcador molecular relacionado con el envejecimiento de la semilla de maíz.

2. ANTECEDENTES

La semilla es el medio natural de dispersión, propagación y perpetuación de muchas especies vegetales, pues contiene sustancias nutritivas, la maquinaria metabólica y las estructuras celulares necesarias para formar una nueva planta.

Contrario a lo que mucha gente piensa, el maíz, gramínea pródiga del Valle de Tenochtitlán, no solo es un alimento básico que data desde las culturas prehispánicas, sino que también tiene un importante valor como insumo industrial (Zuber y Darrah, 1987; Jugenhermer, 1976).

A. USOS INDUSTRIALES Y AGRONÓMICOS DEL MAÍZ

El maíz, que durante cientos de años ha sido la base de la alimentación del mexicano, ofrece otros usos más allá de la tortilla. Se estima que existen cerca de 800 productos que de una u otra forma son derivados del maíz o incluyen en su composición alguna parte de éste. De las distintas partes de la planta, el grano y sus componentes proporcionan a la industria, a la agronomía y al hombre, la materia prima más variada y utilizada. Los principales usos de la planta del maíz se agrupan de la siguiente forma:

1. Grano.

- **Jarabe de glucosa.** Se utiliza como edulcorante, retenedor de humedad, potencializador del sabor o inhibidor de la cristalización en las industrias panificadoras, confitera y galletera.
- **Almidón refinado.** Se usa con trigo para galletas y pastas. Es adhesivo, aglomerante y logra viscosidad en papel y cartón. Da cuerpo y resistencia a hilos y telas, y es buen estabilizador y colorante de cerveza. El almidón

mezclado con algunos otros insumos forman una especie de atole que sirve para enfriar las barretas que se utilizan para perforar los pozos petroleros.

- **Almidón ceroso.** Se utiliza para espesar el relleno en pasteles de frutas y como polvo para guantes de cirugía.
- **Aceite.** Es preferido por su sabor suave y su alto contenido de ácidos grasos insaturados que reduce los niveles de colesterol al emplearse en la dieta.
- **Dextrosa.** Es insumo en la industria alimenticia y farmacéutica. Sirve para producir sueros intravenosos.
- **Pasta de germen, gluten y cascarilla.** Base para la elaboración de alimento balanceado para ganado vacuno, porcino y aves de corral.
- **Alta Fructosa.** Es un jarabe de maíz con alto grado de pureza y poder edulcorante, que se utiliza en la industria alimentaria y refresquera.
- **Maltodextrinas.** Se usan en sustitutos de leche y concentrados alimenticios.
- **Sorbitol.** La industria farmacéutica lo utiliza para retener humedad y sabor en pastas de dientes. A la industria alimenticia le sirve en gomitas, rellenos y productos congelados, realza el brillo del caramelo macizo.
- **Medio nutritivo para fermentaciones.** La producción comercial de antibióticos por fermentación utiliza como fuente preferida de carbohidratos, jarabe de maíz dextrosa, almidón, etc. Del proceso de fermentación se puede obtener tetraciclina, penicilina, neomicina y bacitracina. También se puede obtener vitaminas B2 y B12, ácido cítrico, ácido glutámico, ácido láctico y lisina.
- **Derivados industriales del maíz.** Diversos derivados del maíz se pueden utilizar como blanqueadores por el alto contenido de ácido cítrico en el

maíz, y como insumo para la fabricación de detergentes, alimentos o bebidas en los que se requiera un color mas tenue o cristalino.

2. Olote.

Puede ser procesado mecánica o químicamente para producir diferentes tipos de materiales. Los siguientes compuestos se obtienen de la fermentación del olote y tienen diversos usos.

- *Furfural*. Solvente selectivo en la extracción de petróleo crudo y purificación del butadieno.
- *Alcohol furfuril*. Se polimeriza para producir resinas resistentes a la acción de ácidos y solventes.
- *Alcohol tetrahidrofurfuril*. Solvente para resinas, tintas y lacas.
- *Tetrahidrofurán*. Solvente no acuoso para varios compuestos orgánicos

3. Planta

- *Raíz*. Se utiliza como abono para la tierra y combustible para los fogones.
- *Tallo y hojas verdes*. Forraje para el ganado. Las hojas se utilizan para fines artesanales y también para envolver algunos guisos y tamales.
- *Mazorcas*. El olote es un alimento muy generalizado y popular para el hombre de consumo variado y extenso.
- *Estigmas*. Producen diversos efectos medicinales, en forma de té es un buen diurético. En combinación con otras hierbas medicinales alivia el dolor de estómago y detiene el vomito.

Todos estos subproductos, anteriormente mencionados, se obtienen principalmente del maíz amarillo, y a nivel nacional, tan solo el 5% de la producción es de éste, el 95% corresponde al maíz blanco, que se destina

mayormente al consumo humano en fresco, masa o tortillas. En una situación de emergencia, se puede utilizar el maíz blanco para obtener estos subproductos, pero tiene dos inconvenientes: a) que es más caro y b) da rendimientos más bajos (Zuber y Darrah, 1987; Jugenhermer, 1976).

De esta manera, la gran variedad de usos que se le ha destinado al maíz le confiere una importancia estratégica a nivel mundial y una mayor demanda. Para satisfacer la demanda de una población mundial que crece a gran velocidad, mientras que la superficie de tierra cultivable disminuye, es necesario almacenar y tratar de conservar en buen estado las semillas recolectadas en cada cosecha para utilizarlas en cultivos posteriores o como alimento en el futuro. Al ser el maíz un cultivo de temporada, el almacenamiento y conservación del grano de maíz ha sido uno de los principales problemas. Esto se debe a la influencia de las altas temperatura (T) y humedad relativa (HR) de nuestras regiones agrícolas que aceleran el proceso de deterioro de las semillas (Priestley, 1986; Bewley y Black, 1994).

B. ENVEJECIMIENTO

Las semillas al igual que todos los seres vivos envejecen. Este deterioro se caracteriza por una pérdida gradual de la viabilidad y del vigor hasta que finalmente muere. Smith y Berjark (1995) sugieren que el envejecimiento de una semilla debería de ser visto como un proceso gradual y acumulativo; en donde cada vez un número mayor de células mueren, hasta que ciertas regiones de la semilla fallan en realizar funciones importantes. La pérdida de la viabilidad de la semilla se podría considerar como el último paso relevante en la pérdida de vigor (Heydecker, 1972).

Existen diversos factores que incrementan la velocidad del envejecimiento de semillas:

Factores genéticos. Diversos autores han demostrado que cuando semillas de diversas especies o de diversos genotipos de una misma especie se almacenan en condiciones similares de humedad relativa (HR) y temperatura (T) su velocidad de envejecimiento es diferente (Priestley, 1986; Moreno y Ramírez, 1987; Bernal-Lugo y Leopold, 1998; Bernal-Lugo *et al*, 1995). Más aún, cuando se hacen cruza de maíz utilizando progenitores con diferente longevidad o P_{50} (Período de tiempo en que el 50% de la población perdió su viabilidad), la progenie hereda la característica de longevidad del progenitor más longevo (Lindstrom, 1942; Hernández *et al* , 1998). Sin embargo, las condiciones variables del ambiente durante el desarrollo de la semilla, el procedimiento de cosecha, así como las condiciones de almacenamiento pueden amplificar las diferencias genéticas entre especies y cultivares (Smith y Berjak, 1995; Lindstrom, 1942; Scott, 1980).

Factores ambientales. Las condiciones de temperatura, de precipitación pluvial, de fotoperíodo y de tipo de suelo que prevalecen durante el desarrollo y cosecha de las semillas, influyen sobre el contenido de sustancias de reserva de la semilla, así como en su vigor y longevidad (Citado en Smith y Berjak, 1995).

Las condiciones de HR y T durante el almacenamiento de semillas también afecta la longevidad de la semilla. Se ha demostrado que estos factores son promotores de diversos procesos oxidativos responsables de cambios deteriorativos en las semillas. Algunos de estos procesos son oxidaciones causados por radicales libres, por deshidrogenación enzimática, por oxidación aldehídica de proteínas y/o por reacciones de Maillard que degradan y/o alteran organelos, estructuras y funciones esenciales para la viabilidad, vigor y desarrollo normal de la plántula, así

como, también favorecen la proliferación de hongos e insectos de almacén (Priestley, 1986; Moreno, 1984; Smith y Berjak, 1995; Bernal-Lugo y Leopold, 1998). En la figura 1 se muestran algunos factores ambientales que son promotores de la formación de radicales libres y que podrían incrementar la velocidad del deterioro de semillas, al igual que lo hacen las condiciones de alta humedad relativa y de temperatura.

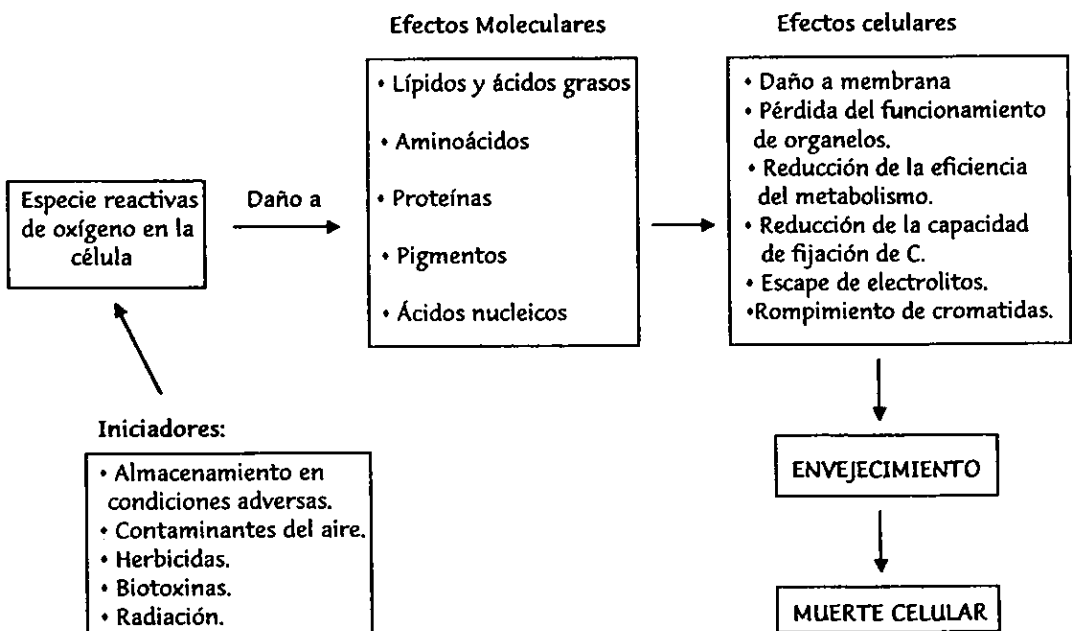


Fig. 1 Factores que incrementan la velocidad de deterioro de semillas, debido a que son promotores para la formación de EROs (Tomado de: Scandalios, J.G. 1993).

Factores mecánicos. La mecanización en el proceso de cosecha de la semilla puede causar daños físicos en la semilla, y de forma adicional, el excesivo secado de la misma la vuelve sumamente quebradiza, facilitando la invasión de hongos y bacterias. Estos daños afectan la calidad de la semilla (Citado en Smith y Berjak, 1995).

Factores intrínsecos. Debido al metabolismo normal de una semilla viva, ocurren cambios en la macromoléculas y metabolitos esenciales, dando lugar a la acumulación de sustancias tóxicas; que a largo plazo causan un efecto dañino a la semilla (Citado en Smith y Berjak, 1995).

Factores patológicos. La semilla puede sufrir ataque de pájaros, hongos, insectos y bacterias (Citado en Smith y Berjak, 1995).

Cambios asociados con el envejecimiento de la semilla

Existen muchos cambios morfológicos, estructurales y bioquímicos que están asociados al deterioro de la semilla, pero actualmente es difícil discriminar entre los eventos primarios y secundarios. Los siguientes eventos se sugieren que son los principales, pero no los únicos (Smith y Berjak, 1995):

1. Bioquímicos

- Aberraciones cromosomales y daño en el ADN (Citado en Priestley, 1986 y en Smith y Berjak, 1995)
- Cambio en la síntesis de ARN y proteínas (Citado en Priestley, 1986 y en Smith y Berjak, 1995).
- Cambios en las enzimas y en las reservas nutritivas (Priestley, 1986).

- Deficiencias en la actividad respiratoria y en la producción de ATP (Citado en Priestley, 1986 y en Smith y Berjak,1995).
- Alteraciones y disminución de las actividades metabólicas a nivel de membrana y de organelos celulares. Esto se puede presentar aún cuando la viabilidad y el vigor no han caído significativamente (Citado en Priestley, 1986 y en Smith y Berjak,1995).
- Diversos estudios proponen que hay una disminución en el nivel de fosfolípidos de membrana debido a dos posibles causas: 1) Peroxidación; 2) Acción de fosfolipasas (Priestley, 1986).
- El aumento en la temperatura y en el contenido de humedad en las semillas almacenadas, incrementan el nivel de ácidos grasos (Tóxicos para las células en contenidos elevados) provenientes de hidrólisis de lípidos por medio de lipasas (Citado en Priestley, 1986 y en Smith y Berjak,1995).

2. Estructurales y morfológicas

- Las irregularidades genéticas se presentan en la semilla como: aborto del polen, mutaciones fenotípicas de la clorofila y desarrollo anormal en la radícula y en la plántula (Priestley, 1986).
- Cambio en el color de la testa (Priestley, 1986).
- Falta de integridad y permeabilidad en la membrana al igual que en los organelos afectando su estructura esencial para llevar a cabo sus funciones metabólicas (Priestley, 1986).
- La estructura de los ribosomas puede tener algún grado de alteración o deficiencia por lo que la síntesis de proteínas se vuelve deficiente (Priestley, 1986).

C. FITOMEJORAMIENTO Y TÉCNICAS DE SELECCIÓN.

El proceso de fitomejoramiento se realiza a través de la selección de progenitores con caracteres importantes, la cruce de éstos y la selección en la descendencia de los individuos que poseen los caracteres deseados. Posteriormente, se sigue un proceso de multiplicación de la progenie seleccionada por medio de varias autofecundaciones sucesivas, formando líneas, y seleccionando únicamente las plantas que presentan características fenotípicamente similares y deseables. Esto lleva a la creación de variedades mejoradas que presenten todas las características que deseamos, así como una uniformidad en su genotipo (Cortinas-Escobar, 1997; Poehlman, 1987).

La etapa crucial en la búsqueda de variedades con mejores características agronómicas la constituye el proceso de selección de los individuos que poseen los caracteres deseados. Esta selección se puede hacer: 1) a través de los caracteres fenotípicos de las plantas individuales o familias de plantas (Gale y Witcombe, 1992) ó 2) a través de marcadores moleculares ligados a características deseables. A este tipo de selección también se le denomina genotípica o indirecta.

En el primer caso, la selección fenotípica, el fitomejorador observa el fenotipo de los individuos de la progenie y escoge los que presentan el carácter de interés. Los individuos escogidos se utilizan en las etapas sucesivas del programa de fitomejoramiento. Esta forma de selección aún cuando brinda frutos cuantificables presenta algunas desventajas:

a) Las plantas deben llegar a madurez fisiológica para poder conocer sus características (Poehlman, 1994).

- b) Se deben probar y seleccionar un gran número de plantas de la progenie para asegurar que al menos una de ellas presente un genotipo superior (Knapp, 1998).
- c) La progenie seleccionada lleva una mezcla de genotipos inferiores y superiores (Knapp, 1998).
- d) El tiempo requerido para lograr una selección efectiva es muy largo.
- e) La dificultad que representa el mantener los orígenes de los genotipos, esto se debe a que se va perdiendo la variabilidad genética, debido a las autofecundaciones sucesivas que se realizan para obtener líneas puras (Ramachandran, 1992).
- f) Los fenotipos seleccionados en las plantas pueden ser modificados por estreses ambientales a los cuales pueden estar sometidas (Poehlman, 1987).

La selección por medio de la identificación de marcadores moleculares ligados a características deseables, y su posterior utilización en programas de selección puede contribuir a reducir el tiempo estimado para la liberación de variedades mejoradas de plantas (Cortinas-Escobar, 1997). Un marcador molecular es una etiqueta ligada al gene o genes que controlan el carácter deseado, pero no forma parte del gene mismo. Se denomina así porque es detectado a nivel molecular ya sea como proteína (ej. isoenzima) (Powell, 1992) o como secuencias específicas de nucleótidos (ADN).

De esta forma, la selección basada en marcadores de ADN (Citado en Cortinas-Escobar, 1997) permite incrementar la eficiencia de la selección, ya que dichos marcadores son insensibles al ambiente. El uso de los marcadores moleculares, especialmente los que están basados en ADN, ofrece la posibilidad de desarrollar nuevas líneas de investigación en los programas de fitomejoramiento y puede acelerar significativamente las metas establecidas. Algunas de las principales ventajas que hacen apropiados los marcadores moleculares para su uso en los

programas de mejoramiento genético de plantas son las siguientes (Cortinas-Escobar, 1997) :

1. Los genotipos de interés pueden ser identificados utilizando cualquier tejido o célula.
2. Un elevado número de alelos naturales se asocia frecuentemente con marcadores moleculares.
3. Los alelos de los marcadores moleculares normalmente no están relacionados con efectos deletéreos.
4. Algunos marcadores moleculares son codominantes, lo cual significa que todos los genotipos pueden ser identificados en cualquier población segregante.
5. Los efectos pleiotrópicos y de epistasis asociados en marcadores moleculares son muy limitados, por lo que un gran número de marcadores pueden ser estudiados en una población segregante.
6. Los marcadores no son afectados por el ambiente.

Los marcadores de ADN han sido ampliamente usados para generar diversos mapas de ligamiento, para identificar genes de interés, para el diagnóstico de enfermedades genéticas en seres humanos, en estudio de taxonomía a nivel molecular y de evolución de especies (Citado en Cortinas-Escobar, 1997)

Técnicas moleculares para la identificación de polimorfismos de ADN.

Los marcadores moleculares basados en ADN se detectan como diferencias o polimorfismos en la información genética entre individuos. La detección y explotación de polimorfismo en plantas y animales representa uno de los desarrollos más significativos en la biología. Técnicas conocidas como

Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y como ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD) hacen uso de este polimorfismo en plantas para poder asociar marcadores a características agronómicas deseables (Weissinger y Moss, 1992; Fu Yu, 1993). El éxito de este polimorfismo se debe a que las variaciones hereditarias se presentan cuando plantas distintas muestran formas contrastadas de los caracteres de interés. Los caracteres contrastados son determinados por genes contrastados y por la interacción de los mismos con el medio ambiente durante el crecimiento y la diferenciación de la planta. Debido a esto, es importante contar con progenitores contrastantes a las características deseadas y así encontrar un mayor polimorfismo.

Los marcadores moleculares genéticos (ej. RFLP y RAPD) reflejan un mayor número de variaciones directas a nivel de ADN; estas propiedades hacen que tengan ventajas en comparación con los análisis morfológicos o de las proteínas (Powell, 1992; Gale y Witcombe, 1992).

Una de las técnicas que se han empleado con éxito en un gran número de especies es el polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLPs), la cual identifica polimorfismos en ADN a través del uso de enzimas de restricción e hibridaciones mediante el análisis Southern blot. Sin embargo, las principales limitantes para su uso generalizado en los programas de fitomejoramiento son: 1) el uso de materiales radioactivos, 2) una experiencia necesaria en clonación, 3) se requiere una elevada cantidad de ADN, que frecuentemente se dispone solo de plantas maduras, 4) el tiempo requerido para el desarrollo es relativamente elevado, y 5) el costo es relativamente alto. El uso de otros ensayos polimórficos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), requieren de información

previa del ADN blanco para poder diseñar la secuencia del iniciador (Cortinas-Escobar, 1997).

Técnica de ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD).

La técnica que se utilizó para desarrollar esta tesis fue la denominada ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), es la amplificación de ADN basado en la técnica de PCR, la cual detecta diferencias o polimorfismos en una secuencia específica de información, mediante el uso de un solo iniciador de secuencia arbitraria y usualmente de 10 bases de longitud . Este polimorfismo funciona como un marcador genético, ya que simplemente detecta secuencias de ADN que amplifican en un progenitor pero no en el otro (Williams J.G.K *et al* 1990; Williams J.G.K *et al* 1993; Cortinas-Escobar, 1997).

Las principales ventajas de los marcadores RAPD son: no requieren radioactividad ni Southern blotting, necesitan una cantidad reducida de ADN, el costo y tiempo de la aplicación se reducen considerablemente en comparación con los marcadores RFLP (Phillips y Vasil, 1994; Fu Yu, 1993; Hu *et al*, 1991; Yang *et al*, 1993), el costo de los iniciadores es barato, el polimorfismo se detecta fácilmente y se puede hacer una selección inicial de diferentes secuencias de iniciadores en una sola reacción de PCR (Gale y Witcombe, 1992; Fu Yu, 1993; Hu *et al*, 1991; Yang *et al*, 1993). Sin embargo una de sus principales desventajas es que los marcadores RAPD son dominantes, lo cual significa que se segregan en proporción 3:1 y el genotipo heterocigoto no puede distinguirse en un población F_2 . Esta situación puede ser minimizada mediante el uso de poblaciones genéticamente apropiadas tales como dobles haploides, grupos de individuos F_2 , aneuploides o líneas isogénicas (Cortinas-Escobar, 1997; Michelmore *et al*, 1991).

Los marcadores RAPD han demostrado ser muy eficientes en el desarrollo de mapas genéticos y para identificar marcadores asociados con regiones específicas del genoma. Los marcadores RAPD, junto con mezclas de ADN, pueden ser utilizados para localizar genes o secuencias genéticas asociadas con características de interés agronómico.

3. OBJETIVOS

- De diversas poblaciones de maíz seleccionar aquellas de longevidad contrastante.
- Identificar secuencias polimórficas en dos poblaciones de maíz (*Zea mays L.*) de longevidad contrastante.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

El desarrollo experimental fue muy amplio, por lo que se consideró conveniente presentar un resumen del material y métodos, junto con un diagrama de flujo. Los experimentos realizados y el detalle de cada uno de ellos se encuentra en la sección de apéndices, así como el desglose de los materiales biológicos utilizados.

A. Materiales biológicos

1. Se usaron 13 líneas de maíz (*Zea mays L.*). Las líneas fueron denominadas como: EL16, EL17, L4AV, EL21X, L7AV, L9AVE, L3-10AV, L3-19BV, A6-21-2BV, L6AV, L8BV, HS1 y A6.

2. Se probaron 35 oligonucleótidos (referirse al cuadro 12, apéndice 1.2) con una longitud de 10 pares de bases. Estos fueron seleccionados por estar asociados con diferentes tipos de estres y agrupados en la misma forma:

- Modificación de secuencias debido al envejecimiento durante el almacenamiento de semilla de frijol soya, (Shatters R.G., 1995).
- Secuencias seleccionadas al azar.
- Estres xerobiótico (sequía), (Scandalios, 1993).
- Elemento de respuesta al Ácido abscisico (ABA), (Prasad *et al*, 1994; Prasad *et al*, 1990; Gong *et al*, 1998).
- Resistencia al ataque de patógenos, (Scandalios, 1993)

B. Caracterización fenotípica.

1. Envejecimiento acelerado (EA) de las semillas a diferentes regímenes.

Lotes de semilla de cada una de las líneas de maíz, se almacenaron por diversos períodos en 3 diferentes regímenes de envejecimiento acelerado: 1) 100 % HR (obtenida con agua bidestilada) y 40°C; 2) 75 % HR (obtenida con una solución saturada de NaCl) y 30°C; 3) 85 % HR (obtenida con una solución saturada de KCl) y 35°C. A los tiempos establecidos a cada lote de semillas se le evaluó la viabilidad (Apéndice 2.1)

2. Evaluación de viabilidad

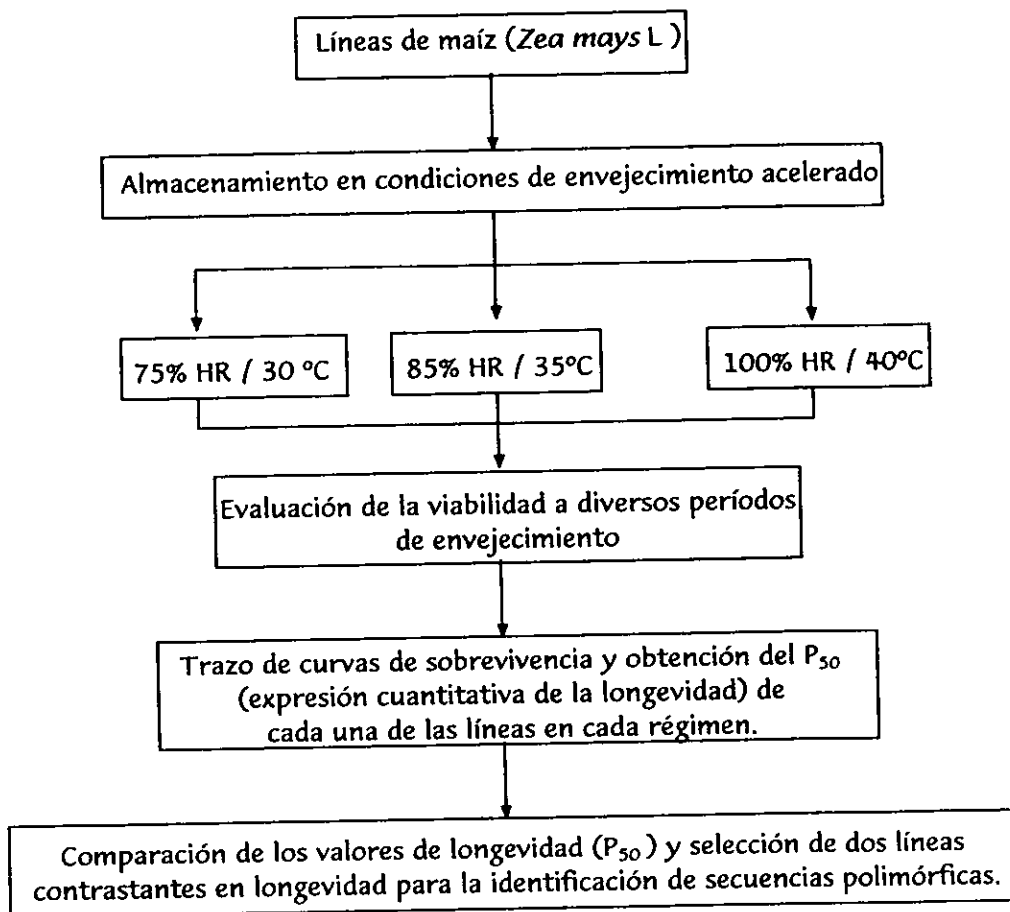
La viabilidad se cuantificó como el porcentaje de germinación de un lote de semillas a los 7 días después de iniciada su imbibición. Esta prueba nos permitió establecer una clasificación del poder germinativo entre las diferentes líneas de semillas de una misma especie (Moreno E, 1984) y se realizó tanto para semillas control como para semillas envejecidas (Apéndice 2.2).

3. Determinación de la sensibilidad al envejecimiento (SE).

La sensibilidad al envejecimiento de una semilla es la rapidez con que su viabilidad disminuye cuando se almacenan en condiciones de humedad relativa (HR) y temperatura (T) extremas. Las trece líneas se almacenaron en tres diferentes regímenes de HR y T; el efecto de las condiciones de almacenamiento se determinó evaluando la viabilidad de la línea contra los días de envejecimiento acelerado (EA). Estos datos se utilizaron para trazar curvas de sobrevivencia, de esta manera, se obtuvieron los valores de P_{50} (Período de tiempo en el que el 50% de la población perdió su viabilidad). A mayor P_{50} menor sensibilidad al envejecimiento, así cuando se compararon los P_{50} de las trece líneas en una misma

condición de almacenamiento, se escogieron dos líneas que presentaran una SE contrastante y que se tuvieran cruzas entre estas dos líneas.

Fig. 2 Diagrama de flujo para la caracterización fenotípica.



C. Caracterización genotípica.

1. Aislamiento y purificación de ADN genómico.

Para el aislamiento de ADN se utilizó la técnica de Dellaporta (1986) con algunas modificaciones para que el ADN estuviera completamente libre de impurezas. Estas impurezas pueden inhibir reacciones enzimáticas, tales como la de la taq ADN polimerasa utilizada en el PCR para la obtención del RAPD. El aislamiento de ADN se realizó a partir de tejido vegetativo de plántula de maíz etiolada (Apéndice 3.1).

2. Análisis electroforético y cuantificación del ADN.

El grado de degradación del ADN puede ser estimado por la electroforesis de una alícuota de la muestra en minigeles de agarosa. El ADN de peso molecular alto se observa como banda bien definida, mientras que el material parcialmente degradado, forma un barrido a lo largo del carril (Apéndice 3.2). El ADN utilizado en las reacciones de RAPD debía ser de alto peso molecular y no presentar degradación. Posteriormente, se realizó la lectura espectrofotométrica para calcular la cantidad de ADN. Las lecturas se hicieron a 260 nm y 280 nm. La relación entre las lecturas a 260 nm y 280 nm (DO_{260} / DO_{280}) provee una estimación de la pureza del ácido nucleico (Apéndice 3.3).

3. Técnica de Amplificación no específica del ADN polimórfico (RAPDs).

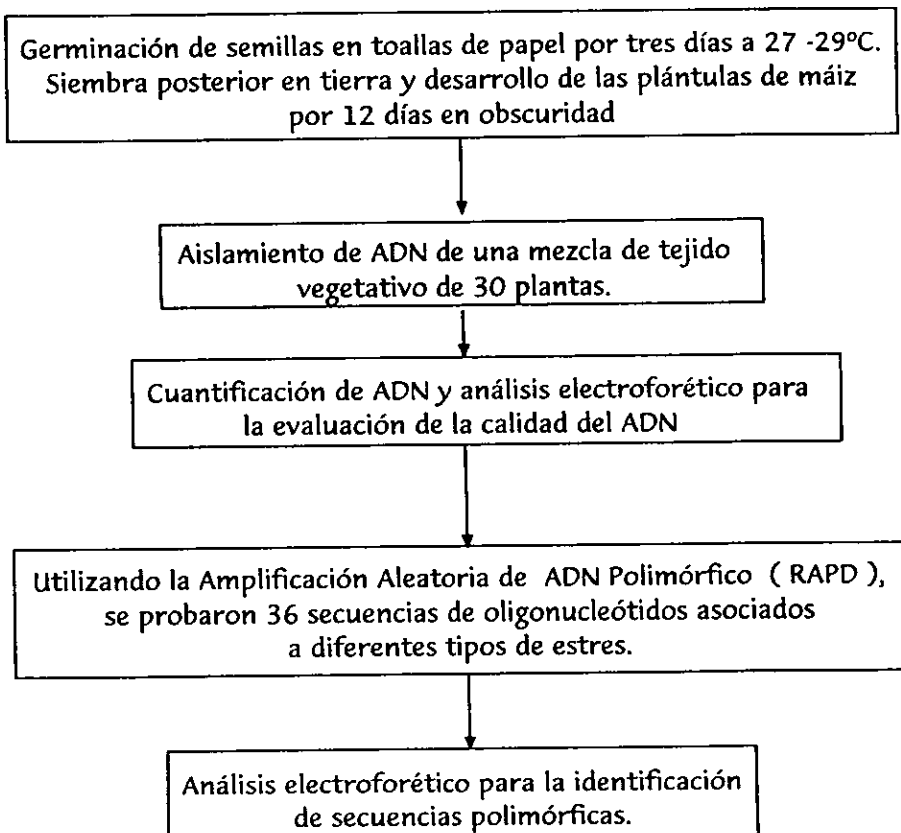
Esta es una técnica novedosa para la identificación de polimorfismo de ADN. Se basa en la amplificación del ADN, donde no se requiere un conocimiento previo de la secuencia blanco del ADN utilizado. Los marcadores RAPDs se generan con la amplificación de segmentos de ADN utilizando un solo primer con una secuencia arbitraria de oligonucleótidos. Como anteriormente se mencionó, se utilizaron 35

secuencias de oligonucleótidos asociados a diferentes tipos de estrés (Apéndice 3.4).

4. Efecto del envejecimiento en la integridad del ADN de la semilla.

Los oligonucleótidos que generaron fragmentos polimórficos en estas líneas se utilizaron para evaluar el posible polimorfismo en el ADN de plántulas germinadas por 12 días provenientes de semillas envejecidas a 100 % de HR y 40°C durante 4 y 8 días. Se hicieron 3 repeticiones de cada reacción y solo los productos reproducibles fueron considerados.

Fig. 3 Diagrama de flujo para la caracterización genotípica.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

La calidad inicial de las semillas control se evaluó a través de la determinación del contenido de humedad, la viabilidad (% de germinación del lote a los 7 días después de iniciada la imbibición) y el vigor expresado como el V_{650} (velocidad con que germina el 50 % del lote). En los cuadros 1 y 2 y en la figura 4 se muestran los resultados de estas determinaciones.

Cuadro 1. Contenido de humedad inicial de las semillas de maíz incluidas en este estudio

LÍNEA	% HUMEDAD EN PESO FRESCO DE SEMILLA
A6	10
L9AVE	9.2
L3-19BV	9.0
L7AV	9.0
L3-10AV	8.5
L8BV	7.8
EL21X	7.6
L4AV	7.4
HS1	7.1
A6-21-2BV	7.0
EL17	6.0
L6AV	5.6
EL16	4.6

El contenido de humedad (CH) de las semillas en las diversas líneas varió desde el 10 % hasta el 4.6 % (Cuadro 1). De acuerdo a lo reportado en la literatura (Priestley, 1985) el contenido de humedad óptimo de la semilla de maíz es del orden del 8 %. Alrededor de éste contenido de humedad, la semilla se

preserva en almacén por un período mayor, pero durante la imbibición la semilla puede sufrir daño por choque osmótico (Dexter, 1966). Con la finalidad de evitar en lo posible el efecto del choque osmótico en la viabilidad y el vigor de los materiales las diversas poblaciones de maíz utilizadas en este trabajo se almacenaron en una humedad relativa del 100 % a temperatura ambiente durante 12 horas previas a su imbibición. Con este tratamiento, el contenido de humedad de las semillas alcanzó entre 18 y 20 %; contenidos a los que se ha reportado que la semilla no sufre choque osmótico durante su imbibición (Dexter, 1966).

En la figura 4 se muestran las curvas de germinación de algunas de las líneas. Para facilitar la visualización de las curvas solo se muestran las más representativas. En la figura 4 se observa que L6AV, EL16, EL17 y EL21X muestran una fase de retraso antes de iniciar la germinación, al igual que la L4AV (no incluida en la figura), en donde la fase de retraso es más pronunciada en EL17 y EL21X (Fig. 4A). En contraste, las líneas A6, L9AVE, HS1, L7AV, L3-10AV, L3-19BV y L8BV (las tres últimas líneas no incluidas en la figura) (Fig. 4B) no lo muestran. En la figura 4 también se observa que las diversas líneas alcanzan un por ciento de germinación máximo o viabilidad diferente y el tiempo requerido para alcanzar este máximo también varió. Por ejemplo, en la figura 4A, L6AV en un período de 2 días alcanzó un 100 % de germinación, en cambio EL17 y EL21X (Fig. 4A) en un período de 3 días alcanzaron un máximo de germinación, del 95 y 70 % respectivamente. En la figura 4B, A6 alcanzó un 100 % de germinación a los 2 días, siendo inferior en velocidad de germinación y viabilidad L7AV, pues su máximo de germinación, fue de solo 85 %, en 4 días.

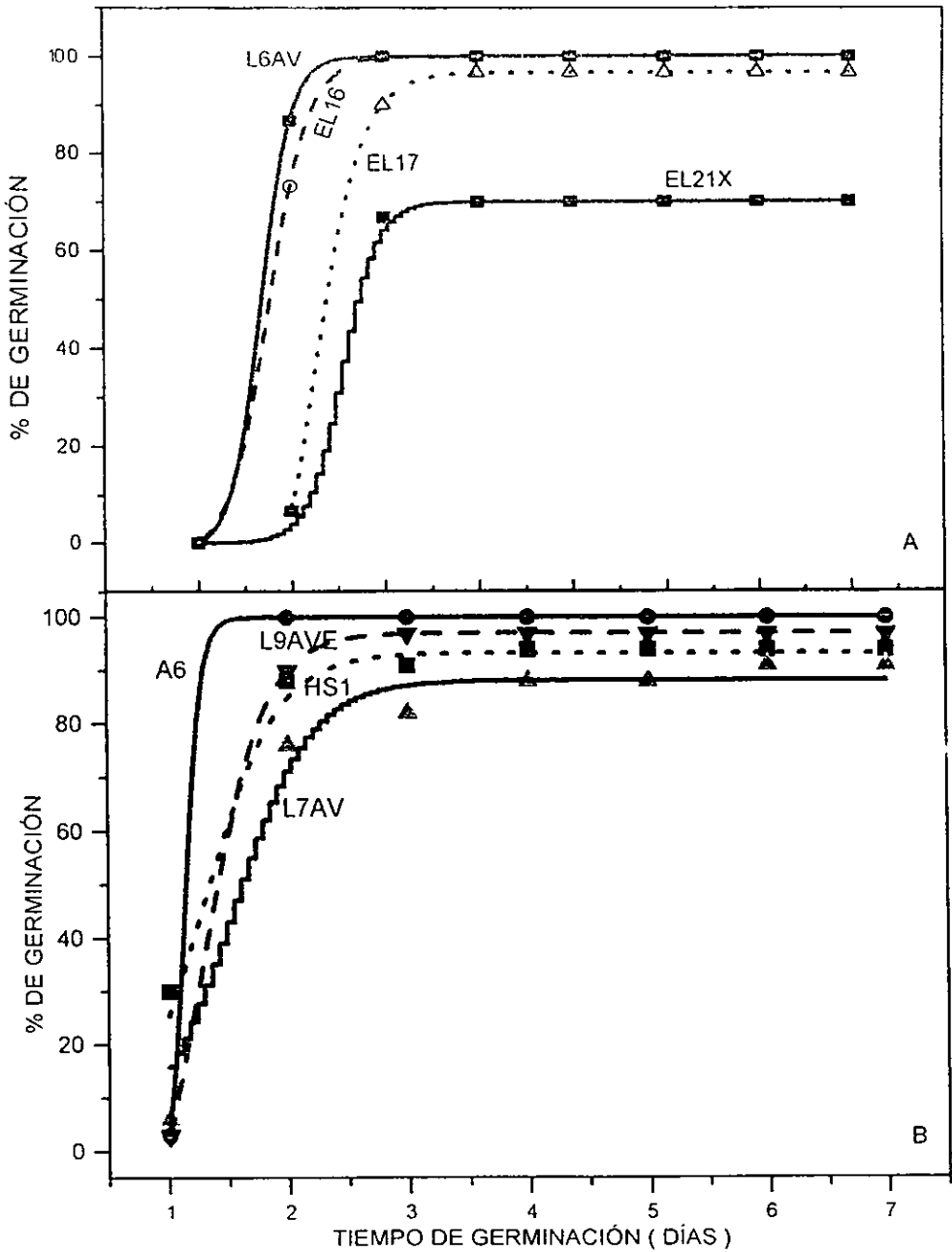


Fig 4. Curvas de viabilidad de diferentes líneas de maíz a tiempo cero de EA (Control). Germinadas por un período de 7 días a 27-29°C.

De curvas de germinación similares a las descritas en la figura 4, se calculó el t_{G50} , que es el tiempo en el que germina el 50 % del lote. Este valor se utilizó para calcular el V_{G50} (velocidad de germinación con que germina el 50 % del lote) que se obtiene del inverso del t_{G50} . La ventaja del V_{G50} sobre el t_{G50} es que su valor es directamente proporcional a la rapidez con que un lote de semillas germinan al 50%, es decir entre dos lotes de semillas, el más vigoroso será aquel que muestre una velocidad de germinación mayor. Mientras que el t_{G50} (tiempo en el que germina el 50 % del lote) es inversamente proporcional, un lote de semillas es más vigorosa al tener un t_{G50} pequeño porque le toma menos tiempo en que el 50% del lote germine.

Los cálculos anteriores se compilan en el cuadro 2. La viabilidad ó porcentaje máximo de germinación de las diversas líneas fue diferente. Once líneas presentaron una viabilidad mayor del 85 %, por lo que se consideraron de alta viabilidad, ya que esta es la viabilidad mínima que debe tener un lote de semillas certificadas (ISTA). Solo una línea presentó una viabilidad del 66 % de germinación por lo que se le denominó de baja viabilidad. Una clasificación similar se realizó considerando el valor de V_{G50} (velocidad de germinación con que germina el 50 % del lote) (Cuadro 2). Al considerar este parámetro las líneas se pueden clasificar de manera arbitraria en tres grupos. Uno de alto vigor con un V_{G50} mayor a 1.0; un segundo grupo donde el V_{G50} fue menor de 1.0 pero mayor de 0.8 al que se le denominó de vigor moderado y un tercer grupo de bajo vigor con un V_{G50} menor a 0.8. Con esta clasificación sólo L6AV y EL16 presentaron alto vigor. Solo en algunos casos las características de viabilidad y V_{G50} fueron similares. L6AV, EL16 y EL21X caen dentro de este grupo, las dos primeras a una

alta viabilidad corresponde un alto V_{G50} ; la última con una baja viabilidad le corresponde un bajo V_{G50} .

Cuadro 2. Viabilidad y velocidad de germinación (V_{G50}) de líneas de maíz a cero días de envejecimiento acelerado (EA)

Líneas	VIABILIDAD ¹ (% Germinación)	V_{G50} ² (días ⁻¹)	CARACTERÍSTICAS DE VIABILIDAD	VIGOR DE GERMINACIÓN ³
L6AV	100 ^a	1.47	ALTA	ALTO
EL16	97 ^a	1.32	ALTA	ALTO
L3-19BV	98 ^a	0.94	ALTA	MODERADO
L4AV	100 ^a	0.91	ALTA	MODERADO
L3-10AV	97 ^a	0.91	ALTA	MODERADO
A6	100 ^a	0.88	ALTA	MODERADO
L8BV	99 ^a	0.88	ALTA	MODERADO
EL17	89 ^a	0.80	ALTA	BAJO
L9AVE	97 ^a	0.78	ALTA	BAJO
HS1	98 ^a	0.75	ALTA	BAJO
L7AV	88 ^a	0.67	ALTA	BAJO
EL21X	66 ^b	0.65	BAJA	BAJO

Los valores de una sola columna seguidos de la misma letra no presentan diferencia significativa ($P < \text{ó igual a } 0.05$).

¹ La viabilidad se midió como el % de germinación de las semillas después de 7 días de imbibición a 27-29°C

² Es la velocidad la que germina el 50 % del lote.

³ Esta clasificación se hizo utilizando únicamente el valor de V_{G50} . El valor de V_{G50} es el inverso de t_{G50} . Siendo t_{G50} el tiempo en el que germina el 50 % del lote.

En términos fisiológicos, el vigor esta relacionado con la velocidad de crecimiento de la radícula, mientras que la viabilidad indica el por ciento de semillas vivas en el lote. Por lo que el hecho de que no coincidan las características de viabilidad y vigor de las líneas indica que las líneas tienen diversas velocidades de crecimiento. Esta característica podría estar dada por la eficiencia con que realizan el proceso de movilización de reservas y/o la relajación de la pared celular. En el primer proceso la enzima limitante es la α -amilasa (Bernal-Lugo *et al.*, 1994) y en el segundo la composición química de la pared celular (Carpita y Gibeaut, 1993).

Varios estudios han confirmado que durante el envejecimiento, se pierden las funciones de la semilla de forma heterogénea. Sin embargo, cuando se traza en una gráfica el % de viabilidad del lote contra el tiempo en almacén la curva de sobrevivencia siempre es una sigmoidea (Ellis y Roberts, 1980). Lo anterior se debe a que dentro de una población de semillas, existen semillas individuales que pueden llegar a presentar diferente vitalidad y el rango de diferencia en su vitalidad describiría una distribución normal (Bradford, 1993). También se sabe que las condiciones del ambiente durante el almacenamiento tienen un gran efecto en la velocidad de muerte de la semilla. Así, para poder establecer de una forma más exitosa las características de sensibilidad al envejecimiento de las poblaciones de semillas se requieren condiciones de deterioro cuya influencia sobre la velocidad de muerte de las semillas sea tal que permitan un envejecimiento gradual de las semillas para que se generen las curvas de sobrevivencia.

Por estas razones, diversos lotes de semillas de cada línea se sometieron a tres regímenes de deterioro acelerado. Los regímenes utilizados se clasificaron de acuerdo a la rapidez con que las semillas se deterioran cuando se almacenan en tales condiciones. Los regímenes utilizados fueron:

1. 100 % HR y 40°C (ALTA)
2. 85 % HR Y 35°C (MODERADA)
3. 75 % HR Y 30°C (BAJA)

De las curvas de sobrevivencia se obtuvo el P_{50} , que es el período de tiempo en el que el 50 % de la población perdió su viabilidad. El P_{50} es una forma cuantitativa de determinar la longevidad de la semilla, por lo que a mayor P_{50} , mayor longevidad y por lo tanto menor SE.

El contenido de humedad que las semillas alcanzaron después de ser sometidas a cada una de las condiciones de almacenamiento fue diferente, siendo mayor para 100 % de humedad relativa (HR) y 40°C con un 18.6 % de contenido de humedad (CH), de 15.2% de CH para 85 % HR y 35°C y de 14.3% de CH para 75% HR y 30°C.

Primeramente se expondrán los resultados obtenidos en el régimen de 100% de humedad relativa y 40°C. Los datos experimentales que se pudieron coleccionar comprenden solo los primeros 10 días de almacenamiento, ya que las semillas almacenadas por un período mayor presentaron una invasión de hongos y al ponerlas a germinar, muchos de los lotes ya habían perdido casi o totalmente su viabilidad. Por lo que los resultados de los lotes almacenados por más de 10 días de EA no se tomaron en cuenta, ya que no se pudo distinguir si la pérdida de viabilidad se debió al deterioro en el almacenaje o a la invasión de hongos. El desarrollo de hongos se debió básicamente a que el porcentaje de humedad que alcanzaban las semillas permitía la proliferación de éstos.

En la figura 5 se muestra el efecto del almacenamiento en la cinética de germinación de 4 diferentes líneas, las cuales representan los cuatro tipos de cinéticas de germinación que se observaron en el resto de los lotes. En los lotes EL16, L3-19BV y L8BV (las dos últimas curvas no mostradas) la velocidad de germinación decreció a medida que aumentó el envejecimiento pero la viabilidad no decreció de manera importante, debido a que desde el punto de vista agronómico un lote de semillas de buena calidad tiene como mínimo un 80% de viabilidad (Figura 5A). El comportamiento del lote EL17 (curva no mostrada), es similar al de los lotes anteriores aunque la viabilidad y la velocidad de germinación se vio disminuida en mayor proporción ya que su disminución fue del 24 y 39% respectivamente.

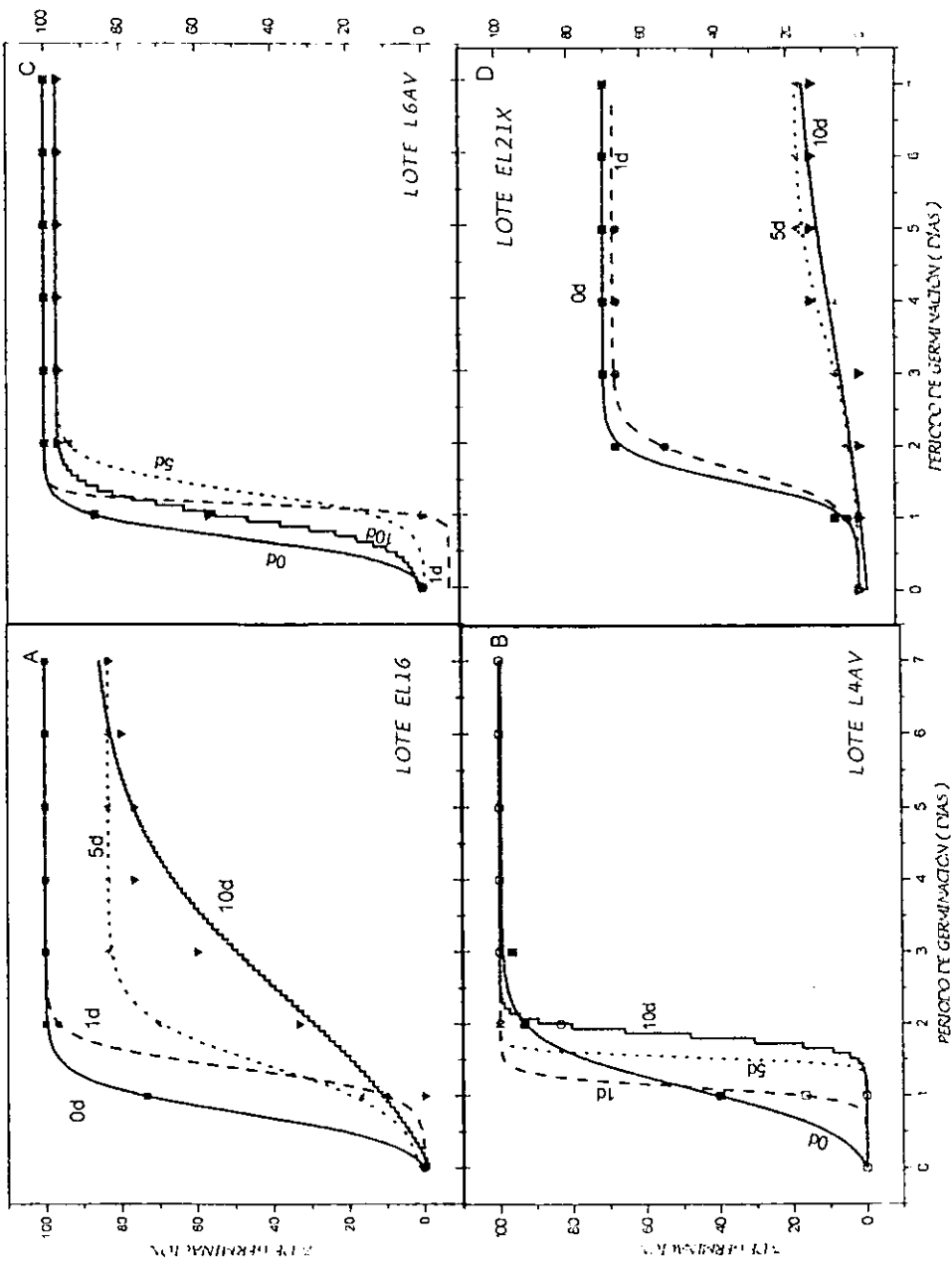


Fig. 5 Curvas de viabilidad de diferentes lotes de maíz, EL16 (A), L4AV (B), L6AV (C) y EL21X (D) sometidas a 0, 1, 5 y 10 días de envejecimiento acelerado a 100% humedad relativa y a una temperatura de 40°C

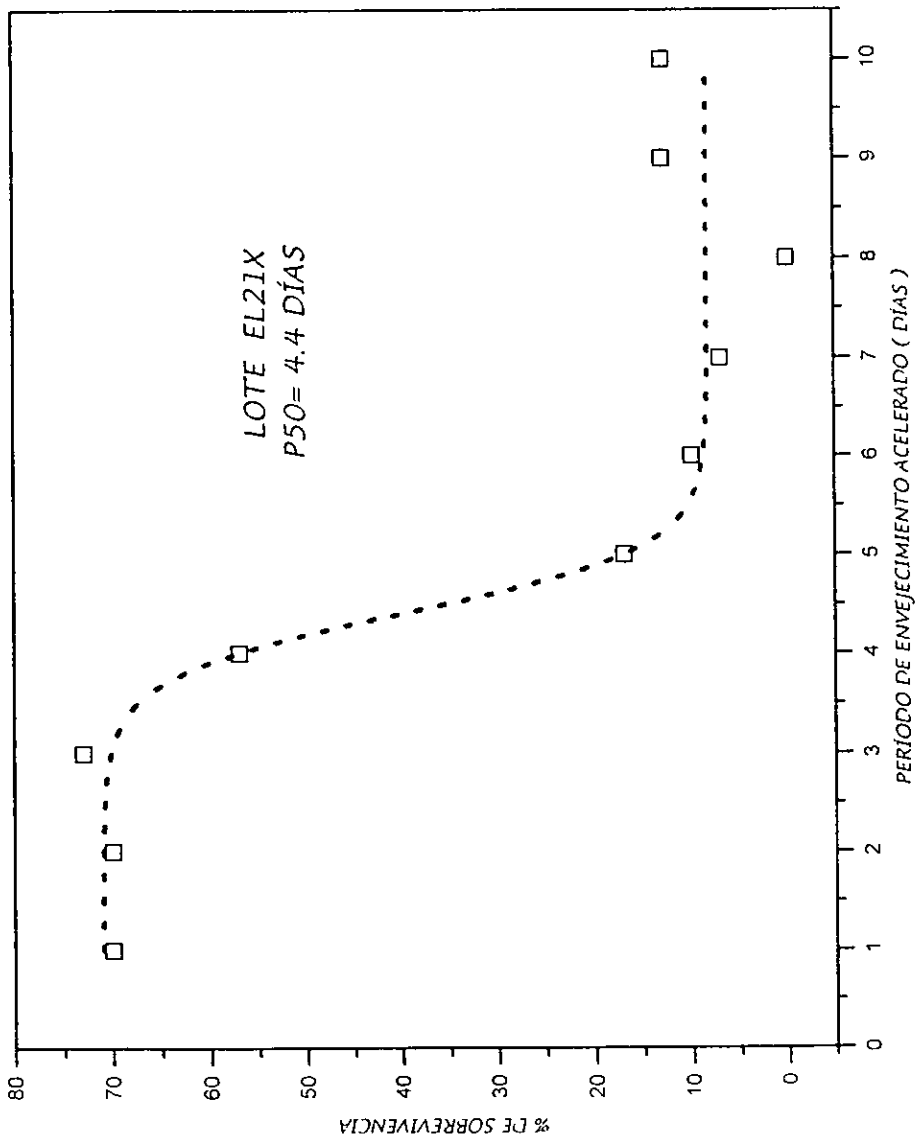


Fig. 6 Curva de sobrevivencia de EL21X sometida a un envejecimiento acelerado de 100% de humedad relativa y una temperatura de 40°C

En contraste, el tratamiento de envejecimiento para el lote EL21X fue lo suficientemente drástico para que en 7 días de almacenamiento la viabilidad disminuyera de manera muy significativa, en un 80% (Figura 5D). Para los lotes L6AV (Figura 5C), L4AV (Figura 5B) y L3-10AV (figura no mostrada) las condiciones de almacenamiento estudiadas no afectaron la viabilidad de la semillas por lo que no fue posible trazar las curvas de sobrevivencia y obtener un valor de P_{50} . Sin embargo, con el lote EL21X se pudo trazar la curva de sobrevivencia con un $P_{50} = 4.4$ días (Figura 6), utilizando para el ajuste de este tipo de curva el programa de origen. Esta línea presentaba desde el inicio una viabilidad deficiente al igual que un bajo vigor, al ser 100 % de humedad realtiva y una temperatura de 40°C un régimen muy drástico, lo que permitió que esta línea tuviera un envejecimiento fisiológico gradual antes que el desarrollo de los hongos se manifestara a partir de los 11 días de envejecimiento acelerado.

Para efecto de comparación en el cuadro 3 sólo se muestran los valores de viabilidad y de V_{G50} (velocidad de germinación) del control y a los 10 días de envejecimiento acelerado.

Cuadro 3 . Viabilidad y velocidad de germinación (V_{G50}) a 0 y 10 días de envejecimiento acelerado (EA) a 100% HR y 40°C.

Líneas	CONTROL		10 DÍAS DE EA		DISMINUCIÓN EN VIABILIDAD (%G)	DISMINUCIÓN EN V_{G50} (%)
	VIABIL. (% G)	V_{G50} (días ⁻¹)	VIABIL. (% G)	V_{G50} (días ⁻¹)		
L6AV	100	1.47	97	1.07	3	27
EL16	97	1.32	83	0.43	14	67
L3-19BV	98	0.94	83	0.61	15	35
L4AV	100	0.91	100	0.54	0	41
L3-10AV	97	0.91	93	0.71	4	22
L8BV	99	0.88	83	0.65	16	26
EL17	89	0.8	67	0.49	24	39
EL21X	66	0.65	13	0.28	80	57

De acuerdo a los valores de disminución en viabilidad y V_{G50} , las líneas se podrían agrupar en cuatro categorías. La primera sería para el lote EL16 donde la pérdida de viabilidad y V_{G50} fue disminuyendo en forma gradual conforme los días de almacenamiento iban aumentando (Figura 5A). Sin embargo, la pérdida de viabilidad fue de tal magnitud que desde el punto de vista agronómico el lote de semillas aún se considera de buena calidad (ISTA). La pérdida de V_{G50} fue mayor siendo del 67%, de todas las líneas que fueron sometidas a este tratamiento, esta línea EL16 fue la que mayor reducción presentó en V_{G50} . Un comportamiento similar a EL16 lo presentaron EL17, L3-19BV y L8BV. Para EL21X la pérdida de V_{G50} fue similar a la de EL16, pero en esta línea la pérdida de viabilidad fue la mayor, de un 80%. Para L6AV y L3-10AV la pérdida de viabilidad fue mínima, de 3 y 4% respectivamente. La disminución de V_{G50} no fue proporcional al avance del período de almacenamiento, en donde el V_{G50} a los 10 días resultó ser mayor, que a los 1 y 5 días de envejecimiento acelerado (Figura 5C), resultando que la pérdida de la V_{G50} fuera la menor de todas las líneas, siendo una disminución de alrededor de un 20%. Para L4AV la viabilidad no fue afectada por el régimen de envejecimiento acelerado, pero su V_{G50} disminuyó de forma considerable al ser de un 41% menor a la inicial.

Bajo condiciones de alta humedad relativa se puede llegar a un equilibrio entre el deterioro y la reparación de los sistemas metabólicos de la semilla. Con el tiempo de deterioro, este equilibrio se pierde y se vuelve a favor del deterioro (Priestley, 1986). Por lo establecido en el párrafo anterior, esto podría ser una explicación del porque la viabilidad de las líneas, con excepción de EL21X, no disminuyó considerablemente durante el tiempo que se sometió a envejecimiento acelerado y el cual no se pudo prolongar, debido al crecimiento de hongos, para que se volviera a favor del deterioro y la semilla perdiera la viabilidad en forma

gradual. Para el caso de EL21X, este régimen de 100 % de humedad relativa y una temperatura de 40°C fue lo suficientemente agresivo para que las semillas sufrieran un envejecimiento fisiológico, antes de que los hongos se empezaran a desarrollar.

Adicionalmente, la presencia de hongos también podría explicar el resultado de que el V_{G50} de las semillas, fuese el parámetro más afectado en este régimen de 100 % HR y 40°C.

Se han realizado diversos estudios donde han propuesto un tipo de resistencia fenotípica en plantas llamada respuesta hipersensible (RH), en la cual la planta deliberadamente induce un mecanismo de defensa que se manifiesta como la muerte de un grupo de células en el sitio donde se tiene la invasión del patógeno. De esta forma, el patógeno se inmoviliza en el sitio de infección, para exponerlo a una serie de moléculas de defensa.

Una de las moléculas de defensa que aparecen, son las especies reactivas de oxígeno, éstas tienen una función dual, ya que actúan como toxinas hacia el patógeno y son las responsables de construir una barrera en la pared celular (PC) de las células. El H_2O_2 es la responsable de inmovilizar un buen número de proteínas de PC, posiblemente a través de la formación de entrecruzamientos covalentes que actúan como una barrera en contra del patógeno (Bolwell, 1995; Snijder et al, 1995; Chen et al, 1995). Chen et al., (1995) han propuesto que una de las razones de la acumulación del H_2O_2 cuando la planta desarrolla la RH, se debe al aumento de la producción del ácido salicílico (SA), el cual comprobaron que inhibe la acción de la catalasa, que es la responsable de la degradación del H_2O_2 a agua y oxígeno. De esta manera, se podría pensar que la velocidad de

desarrollo de la plántulas se ve disminuída por el entrecruzamiento que ocurre en la PC haciendo más difícil que la radícula crezca y rompa la testa para poder germinar. Por lo tanto, el V_{G50} (velocidad de germinación) es el que se ve más afectado por las condiciones de envejecimiento acelerado.

Para el régimen de 75% HR y 30°C, los datos experimentales obtenidos se presentan en el cuadro 4.

Cuadro 4. % de Germinación^a de semillas con EA de 75% HR y 30°C

LÍNEA	0 d EA	24 d EA	51 d EA	75 d EA
EL16	97	82	82	27
EL17	90	82	82	15
L4AV	100	64	73	47
EL21X	66	58	17	8
L6AV	100	100	96	29
L8BV	99	83	71	25
L3-10AV	97	100	58	31
L3-19BV	98	92	90	58
L7AV	87	88	75	21
L9AVE	97	88	96	63
A6-21-2BV	100	88	63	8

^a Promedio de duplicados de 10 semillas cada uno.

Este régimen no fue lo suficientemente agresivo para poder discriminar y de esta manera trazar curvas de sobrevivencia y obtener valores de P_{50} de cada una de las líneas. Se requirieron 75 días de envejecimiento para que la viabilidad de la mayoría de las líneas decayera significativamente, pero esta disminución fue abrupta. Esto hizo que las curvas de sobrevivencia no se ajustaran a una sigmoidea lo que se interpretó como que la frecuencia de mortalidad de las semillas no se ajustó a una distribución normal (Ellis y Roberts, 1980) y por lo tanto las condiciones de almacenamiento no eran las adecuadas. Estas condiciones de almacenamiento inhibieron el crecimiento de hongos debido a la baja HR del ambiente y a la menor temperatura que se utiliza respecto a las del envejecimiento acelerado. Sin embargo, la capacidad de deterioro de este régimen

para todas las líneas fue similar dificultando el distinguir los lotes por su SE, además de que este tratamiento requiere de un período mayor a los otros dos regímenes. Por lo tanto, este régimen no se utilizó como una posibilidad para la caracterización de las líneas en base a su SE.

El régimen de 85% HR y 35°C, permitió hacer una clasificación de las líneas de acuerdo a su sensibilidad al envejecimiento. Con la finalidad de simplificar la visualización de los diversos comportamientos de las líneas durante el envejecimiento, en la figura 7 se representan las curvas de sobrevivencia de algunas de las líneas que ejemplifican dichos comportamientos. Las líneas que presentaron una curva de sobrevivencia similar y solo una de ellas se representa en la figura 7 fueron las siguientes:

- L6AV Y L8BV
- A6 Y HS1
- L3-10AV, L3-19BV Y A6-21-BV

Cuadro 5. Valores de P_{50} y clasificación de las líneas acuerdo a su sensibilidad al envejecimiento a un EA de 85% humedad relativa (HR) y una temperatura de 35°C.

LÍNEAS	P_{50} (días)	SENSIBILIDAD AL ENVEJECIMIENTO
EL16	59	BAJA
A6	46	MODERADA
L6AV	45	MODERADA
L8BV	45	MODERADA
HS1	42	MODERADA
EL17	40	MODERADA
L3-19BV	31	ALTA
L3-10AV	28	ALTA
A6-21-BV	27	ALTA
L7AV	11	ALTA
EL21X	NC	-
L4AV	NC	-
L9AVE	NC	-

P_{50} es el tiempo en que tarda la germinación en caer un 50%
 NC: No calculable

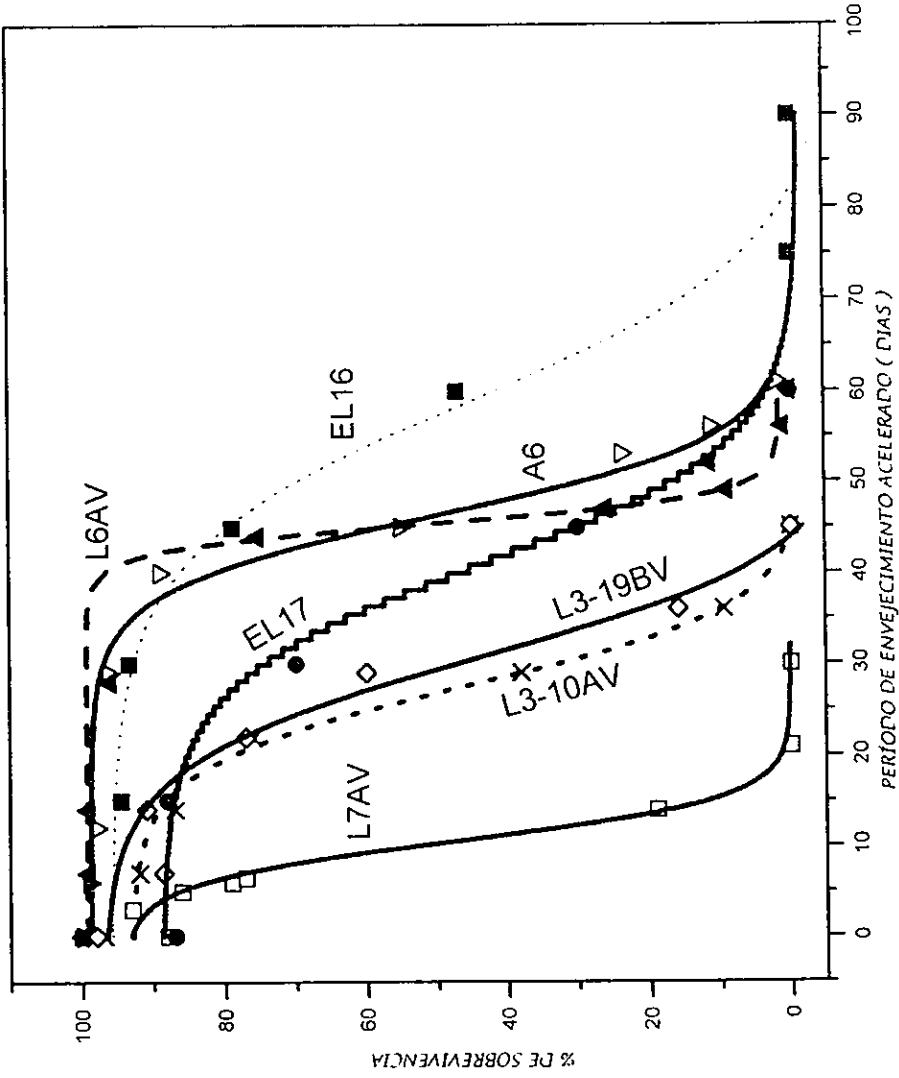


Fig. 7 Curvas de sobrevivencia de cada uno de los comportamientos de las diferentes líneas de maíz sometidas a un envejecimiento de 85% humedad relativa y una temperatura de 35°C

De las curvas de sobrevivencia se calculó el tiempo en el cual el lote almacenado perdió el 50 % de la viabilidad a este parámetro, se le denominó P_{50} . En el cuadro 5 se muestran los valores para cada línea. Entre mayor sea el valor de P_{50} mayor es la longevidad del lote y menor es la sensibilidad al envejecimiento, comparada con otra línea que presentó un P_{50} menor. Tomando en cuenta los valores de P_{50} , las líneas se clasificaron de manera arbitraria en tres grupos. En el primero denominado de baja sensibilidad al envejecimiento, solo se incluye a EL16, con un P_{50} de 59 días. Un segundo grupo de SE moderada en las cuales el P_{50} varió entre 40 y 46 días. En este grupo se incluyeron A6, L6AV, L8BV, HS1 y EL17. El tercer grupo quedó formado por L3-19BV, L3-10AV, A6-21-BV y L7AV. Se le denominó de alta SE porque el P_{50} varió entre 11 y 31 días.


Para las líneas EL21X , L4AV y L9AVE con los datos de % de germinación obtenidos bajo este régimen no fue posible trazar curvas de sobrevivencia por lo que no se pudo calcular el valor de P_{50} y por tanto no se tomaron en cuenta en esta clasificación.

De acuerdo a lo establecido en la literatura, el progreso en la mortalidad de las semillas durante el almacenamiento puede seguir dos tipos de curvas de sobrevivencia. Un tipo, es aquella curva donde las semillas proceden más o menos de forma directa a una fase de muerte rápida. El otro tipo, tiene un período inicial de relativa estabilidad antes de entrar a la fase de disminución rápida de la viabilidad. Estos dos tipos de curvas de mortalidad se pueden obtener entre diferentes especies o bien entre diversos lotes de una misma especie, pero almacenadas bajo diferentes condiciones (Bernal-Lugo y Leopold, 1998)

Tomando en cuenta la magnitud del período de relativa estabilidad en las curvas de sobrevivencia para cada una de las líneas (Fig. 7), éstas pueden agruparse en 3 grupos (Cuadro 6). Un grupo sería el de alta estabilidad de la viabilidad con un período de 33-38 días, y el segundo sería de moderada estabilidad de la viabilidad con un período de 15-23 días y por último el de baja estabilidad de viabilidad, la cual en forma directa entra la fase de rápida pérdida de viabilidad.

Cuadro 6. Clasificación de las líneas de maíz sometidas a 85% HR y 35°C de acuerdo al período en que su viabilidad permanece constante.

BAJA SE	PERÍODO DE ESTABILIDAD (días)	MODERADA SE	PERÍODO DE ESTABILIDAD (días)	ALTA SE	PERÍODO DE ESTABILIDAD (días)
L6AV	38	EL17	23	L7AV	1 - 2
L8BV	38	L3-19BV	15		
EL16	37	L3-10AV	15		
A6	33	A6-21-2BV	15		
HS1	33				



Rapidez con la que entra a la fase de disminución de viabilidad

Con excepción de las líneas EL16, EL17 y L7AV la categoría de sensibilidad al envejecimiento de cada línea dependió del criterio de clasificación utilizado. Esto podría deberse al hecho de que los mecanismos que determinan uno y otro parámetro (P_{50} y período de estabilidad) también son diferentes. A la fase de relativa estabilidad contribuye la estabilidad del estado vítreo, mientras que a la fase de pérdida rápida de viabilidad contribuyen las reacciones de oxidación de las que forman una parte importante las especies reactivas de oxígeno como son el

superóxido. De acuerdo a la literatura, la alta viscosidad del estado vítreo inmoviliza los constituyentes celulares, esto inhibe la difusión y por lo tanto disminuye la velocidad con la que se realizan las reacciones deleterias (oxidación) o cambios en las estructuras o composición química (Sun, 1997; Leopold, Sun y Bernal-Lugo, 1995). Las especies reactivas de oxígeno (ERO) tienen un efecto inmediato a nivel molecular y posteriormente a nivel estructural causando daños irreversibles provocando la muerte de las células (Scandalios, 1993), por esta razón su efecto en la viabilidad de la semilla lo hace tan evidente. El P_{50} refleja de alguna forma el promedio entre la estabilidad del estado vítreo y la capacidad de defensa contra especies reactivas de oxígeno (ERO). En las líneas de baja SE aparentemente ambos tipos de mecanismos están altamente desarrollados, mientras que en el caso de los de alta SE el estado vítreo no se encuentra presente o es muy inestable. En todos los casos deberán contar con el mecanismo de defensa contra ERO aunque la magnitud de este mecanismo podría ser diferente en cada caso.

Si bien para seleccionar dos líneas contrastantes en su sensibilidad al envejecimiento (SE), lo lógico sería escoger las dos líneas extremas en SE, estas no se escogieron para el desarrollo de este trabajo por las siguientes razones: a) Al tener una línea con una sensibilidad al envejecimiento muy alta, es más difícil obtener un número considerable de semillas al ir obteniendo una línea cada vez más pura u homocigota para el fitomejoramiento; y b) Una línea con una muy baja sensibilidad al envejecimiento haría que el período de tiempo necesario para su deterioro sea muy largo y por lo tanto el tiempo de experimentación también.

De forma general, EL16 presentó una mayor viabilidad que EL 17 en los tres regímenes de deterioro, siendo de forma más contrastante y discriminativa en el régimen de 85 % HR y 35°C. El P_{50} de EL16 fue de aproximadamente 35% mayor al P_{50} de EL17 mientras que el tiempo que dura la fase de relativa estabilidad en el lote EL16 es 40 % mayor que en EL17. Por los datos anteriores, a EL16 se le denominó como de baja sensibilidad al envejecimiento y a EL17 de moderada sensibilidad al envejecimiento.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los tres regímenes a los que se sometieron las líneas de maíz y a la disponibilidad de semillas con las que se contaba se escogieron como las dos líneas contrastantes a EL16 y EL17.

B. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS POLIMÓRFICAS.

La caracterización genotípica de estas dos líneas contrastantes en longevidad, se comenzó creciendo plántulas etioladas de 15 días de germinación haciendo lotes de 30 plantas cada uno. Se aisló ADN de varios lotes de cada una de estas dos líneas seleccionadas. El ADN de estas dos líneas contrastantes se utilizó para realizar RAPDs probando 35 oligonucleótidos (Cuadro 7). Estos se seleccionaron por estar asociados con diferentes tipos de estreses, los cuales podrían compartir algunas respuestas moleculares con el envejecimiento durante el almacenamiento, ya que en todos los casos sus efectos deletereos son mediados por especies reactivas de oxígeno. Diversas evidencias demuestran que estas especies reactivas de oxígeno están involucradas en el envejecimiento.

Cuadro 7. Nombre y secuencia del extremo 5' al 3' de los oligonucleótidos utilizados. Estos oligonucleótidos están agrupados de acuerdo a los diferentes tipos de estrés a los que fueron asociados.

Envejecimiento durante el almacenamiento	Secuencias seleccionadas al azar ²	Estrés Xerobiótico. ³
OPA02 TGCCGAGCTG	A4 AATCGGGCTG	EX1 GTGACATAGC
OPA09 GGGTAACGCC	A5 AGGGGTCTTG	EX2 GTGACAATGC
OPA10 GTGATCGCAG	A8 GTGACGTAGG	EX3 GTGACATTGC
OPA20 GTTGCATCC	A19 CAAACGTCGG	EX4 GTGACAAAGC
OPB12 CCTTGACGCA	B15 GGAGGGTGT	
OPC07 GTCCCGACGA	C4 CCGCATCTAC	Elemento de respuesta a ABA. ⁴
OPD01 ACCGCGAAGG	C8 TGGACCGGTG	ABA01 GCCACGTACA
OPD03 GTCGCCGTCA	C11 AAAGCTGCGG	ABA02 TACCGACATC
OPG14 GGATGAGACC	C17 TTCCCCCAG	ABA03 TACCGACATA
OPH07 CTGCATCGTG	D11 AGCGCCATTG	ABA04 CACGTGACGT
	H5 AGTCGTCCCC	
	G18 GGCTCATGTG	Resistencia al ataque de patógenos. ⁵
	I 16 TCTCCGCCCT	
	H7 CTGCATCGTG	OPA14 TCTGTGCTGG
	F14 TGCTGCAGGT	OPAC20 ACGGAAGTGG

¹ Modificación de secuencias debido al envejecimiento durante el almacenamiento de semilla de frijol soya, (Shatters R.G., 1995).

² Secuencias seleccionadas al azar.

³ Estrés xerobiótico (sequía). Es un estrés ambiental que estimula la generación de ERO (Scandalios, 1993).

⁴ Elemento de respuesta al Ácido abscísico (ABA). Se ha demostrado que la presencia de ABA exógeno y endógeno aumenta la termotolerancia en plántulas de maíz, así como la disminución del estrés oxidativo cuando plántulas de maíz se someten a un estrés por frío (Prasad et al, 1994; Prasad et al, 1990; Gong et al, 1998).

⁵ Resistencia al ataque de patógenos. Los patógenos pueden estimular la generación de ERO (Scandalios, 1993).

Para tener una clasificación preliminar, cada uno de los oligonucleótidos se probaron por duplicado. Las secuencias que presentaban un posible polimorfismo se hicieron por triplicado para asegurar la reproducibilidad de las bandas que presentaban cada una de las líneas, así como descartar los posibles artefactos. Los perfiles de los productos de amplificación de cada una de las líneas fueron comparados para la identificación de posibles polimorfismos.

En la Figura 8 se presentan algunos ejemplos de como se determinó el que algunas secuencias no eran polimórficas y otras secuencias que no presentaron producto de amplificación. Por ejemplo, se puede observar en el carril 1 y 2 de la figura 8 que corresponden a EL16 y a EL17 respectivamente, dos bandas no polimórficas, una de 575 pb y la otra de 477 pb. Como las dos bandas se presentan en las dos líneas, esto considera a la secuencia utilizada como no polimórfica. En los casos en que ninguna de las dos líneas presentaron bandas, fue porque en ninguna de las líneas se encontraban estas secuencias y no hubo producto de amplificación, observándose en el carril 9 y 10 de la figura 8. Se clasificaron como secuencias polimórficas aquellas que amplificaron en una línea pero no en la otra, como en el caso de la figura 9, carriles 2 y 3. Para descartar la posibilidad de no haber encontrado producto de amplificación debido a las condiciones de la amplificación, los RAPDs se realizaron por duplicado y siempre se corría un control positivo y uno negativo. Para el control positivo se utilizó un oligonucleótido y un ADN que sabemos presentan productos de amplificación. El control negativo son todos los componentes para realizar el RAPD, pero sin ADN.

De acuerdo a lo anterior, las secuencias utilizadas para los RAPDs pueden agruparse en tres categorías de acuerdo al polimorfismo presentado entre EL16 y EL17(Cuadro8).

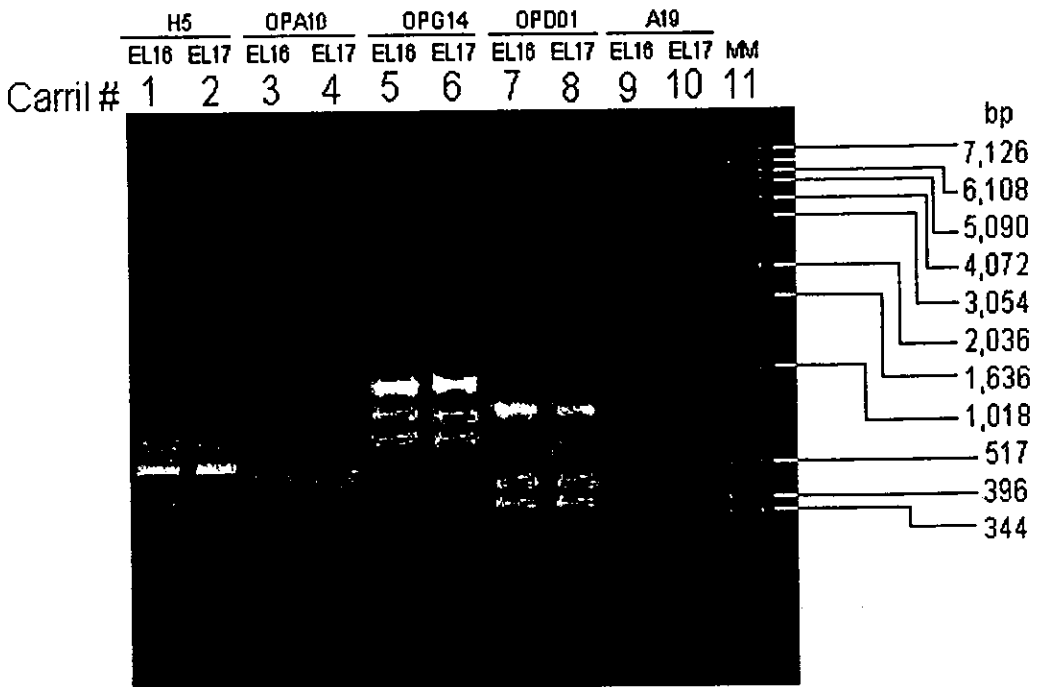


Fig. 8 Gel de ADN al 1.5% (p/v). Productos de amplificación de RAPD de algunos oligonucleótidos que no presentaron polimorfismo y de los que no amplificaron. Carril 1 y 2, productos de amplificación de ADN de EL16 y EL17, respectivamente, con el oligonucleótido H5 (5'-AGTCGTCCCC-3'). Carril 3 y 4, productos de amplificación de ADN de EL16 y EL17, respectivamente, con el oligonucleótido OPA10 (5'-GTGATCGCAG-3'). Carril 5 y 6, productos de amplificación de ADN de EL16 y EL17, respectivamente, con el oligonucleótido OPG14 (5'-GGATGAGACC-3'). Carril 7 y 8, productos de amplificación de ADN de EL16 y EL17, respectivamente, con el oligonucleótido OPD01 (5'-ACCGCGAAGG-3'). Carril 9 y 10, ADN de EL16 y EL17, respectivamente, que no amplificó con el oligonucleótido A19(5'-CAAACGTCGG-3'). Carril 11, Marcadores de una escalera de ADN de 1Kb (MM).

NOTA: Los valores de pares de bases (pb) en la figura no coinciden con los del cuadro 9, debido a que los valores del cuadro se obtuvieron del promedio de pb de varios gels y a las variaciones normales que se presentan entre cada gel. Esta figura corresponde a un gel independiente.

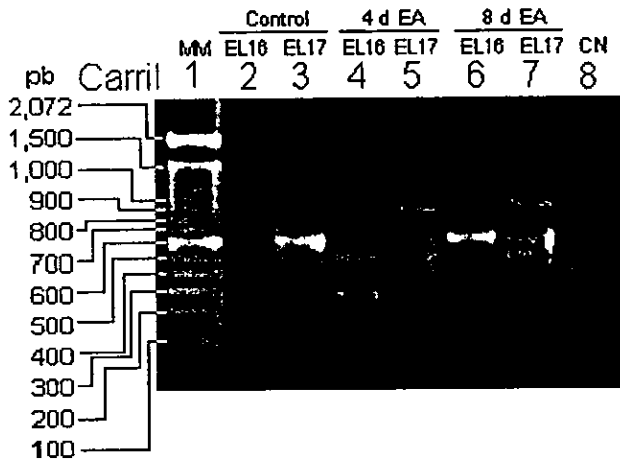


Fig. 9 Gel de ADN al 1.5% (p/v). Productos de amplificación de RAPD que presentaron polimorfismo con el oligonucleótido H7 (5'-CTGCATCGTG-3'). Carril 1, Marcadores de PM (MM) de una escalera de ADN de 100 pb. El marcador cuenta con bandas desde 100 pb hasta 1,500 pb y una banda adicional de 2,072 pb. Carril 2, ADN de EL16 control. Carril 3, ADN de EL17 control. Carril 4, ADN de EL16 con 4d de EA (100% HR/40°C). Carril 5, ADN de EL17 con 4d de EA (100% HR/40°C). Carril 6, ADN de EL16 con d EA (100% HR/40°C). Carril 7, ADN de EL17 con d EA (100% HR/40°C). Carril 8, control negativo (CN), son todos los componentes para realizar el RAPD, pero sin ADN.

NOTA: Los valores de pares de bases (pb) en la figura no coinciden con los del cuadro 11, debido a que los valores del cuadro se obtuvieron del promedio de pb de varios gels y a las variaciones normales que se presentan entre cada gel. Esta figura corresponde a un gel independiente.

Cuadro 8. Clasificación de las 35 secuencias de oligonucleótidos utilizadas en los RAPDs de acuerdo al polimorfismo presentado entre EL16 y EL17.

SECUENCIAS QUE NO AMPLIFICARON			SECUENCIAS QUE NO PRESENTARON POLIMORFISMO		SECUENCIAS POLIMORFICAS
ABA02	OPA20	D11	OPA09	OPC07	EX1
ABA03	A4	C11	OPA02	H5	ABA04
EX2	A5	B15	OPG14	ABA01	H7
EX4	A8	C4	OPB12	EX3	
OPD03	A19	G18	OPD01		
OPA14	C17	F14	OPA10		
OPH07	I16				
OPAC20	C8				

De un total de las 35 secuencias de oligonucleótidos probados, 22 no presentaron productos de amplificación, 10 presentaron productos de amplificación pero no polimórficos y 3 secuencias presentaron polimorfismo entre EL16 y EL17.

En el cuadro 9 se presentan los resultados de las bandas que fueron no polimórficas, así como las tres secuencias de oligonucleótidos, H7, EX1 y ABA04 que presentaron bandas polimórficas entre EL16 y EL17. Con excepción de la banda EX1-598 pb que no es polimórfica entre EL16 y EL17. Cada una de las bandas se denominó primero con el nombre de la secuencia con la que amplificó y seguido con el tamaño de la banda expresado en pares de bases (pb) (Cuadro 9).

En general, el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados fue desde las 200 pb hasta las 2000 pb. El número de bandas para cada una de las secuencias probadas variaron dependiendo de la secuencia probada y de la línea de maíz

utilizada. El rango del número de bandas fue desde una banda, en la mayoría de los casos, hasta 6 bandas con las secuencias amplificadas. Se observaron un total de 25 bandas, de las cuales 18 fueron bandas no polimórficas y 7 bandas fueron polimórficas y únicas.

Cuadro 9. Clasificación de los RADPs para las secuencias que no presentaron polimorfismo y de las que presentaron polimorfismo.

SECUENCIAS NO POLIMÓRFICAS			SECUENCIAS POLIMÓRFICAS		
OLIGO- pb	EL16	EL17	OLIGO-pb	EL16	EL17
OPA09 - 350	+	+	H7 - 643	-	+
314	+	+			
282	+	+	EX1 - 1414	+	-
OPA02 - 1984	+	+	846	+	-
1597	+	+	686	+	-
682	+	+	598*	+	+
OPG14 - 960	+	+	431	+	-
OPB12 - 701	+	+	269	-	+
OPD01 - 750	+	+			
420	+	+	ABA04 - 376	+	-
360	+	+			
OPA10 - 435	+	+			
OPC07 - 575	+	+			
H5 - 575	+	+			
477	+	+			
ABA01 - 390	+	+			
EX3 - 865	+	+			

* Esta es la única banda para EX1 que no presenta polimorfismo entre EL16 y EL17

Los RAPDs son marcadores genéticos dominantes (Williams *et al*, 1990; Haley *et al*, 1993) por lo que cada banda electroforética detectada como producto de amplificación de ADN genómico utilizando iniciadores de 10 oligonucleótidos y la reacción de PCR, se interpreta como un locus particular (Williams *et al*, 1990). De acuerdo a esta interpretación se detectaron 23 loci en EL16 y 20 en EL17. De los loci detectados solo el 17% fue polimórfico. Para identificar marcadores

genéticos moleculares ligados a un carácter cuantitativo, como es en el caso del envejecimiento (Poehlman, 1987), se requieren entre 100 a 150 loci polimórficos entre dos individuos genéticamente diferentes y heredados en la progenie (Torres *et al*, 1993; Helentjans *et al*, 1986).

Tomando en cuenta lo anterior, la identificación de marcadores genéticos moleculares ligados al envejecimiento involucra las siguientes etapas:

- 1) Selección de progenitores que muestren una contrastante sensibilidad al envejecimiento (SE).
- 2) Identificar en los progenitores polimorfismos suficientes para construir grupos de ligamiento (frecuentemente entre 200 y 300 loci).
- 3) Identificar secuencias polimórficas heredadas en la descendencia (frecuentemente entre 100 y 150 loci) y evaluación del fenotipo (sensibilidad al envejecimiento).
- 4) Correlación estadística entre fenotipo y loci heredado para encontrar marcadores genéticos moleculares.
- 5) Aplicación de fitomejoramiento con el uso de la Selección asistida por marcadores (SAM).

Los resultados descritos en esta sección establecen bases para continuar con la identificación de los loci polimórficos faltantes de la fase 2 que permitan continuar el proyecto.

C. ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE LAS SECUENCIAS POLIMÓRFICAS CON EL ENVEJECIMIENTO ACELERADO.

Los siguientes experimentos se realizaron con la finalidad de demostrar si algunos de las secuencias polimórficas identificadas en las líneas contrastantes se afectaban por efecto del envejecimiento. Las secuencias polimórficas en las líneas control EX1, ABA04 y H7 se probaron con material envejecido de EL16 y de EL17 a 100 % HR y 40°C durante 4 y 8 días de envejecimiento. Como era de esperarse la viabilidad de la línea de mayor SE, EL17, disminuyó en mayor proporción que la de EL16, la línea menos sensible al envejecimiento (Cuadro 10).

Cuadro 10. Viabilidad de EL16 y EL17 a 100% HR y 40°C durante 4 y 8 días de envejecimiento.

	VIABILIDAD ^a a 4 d EA (% Germinación)	VIABILIDAD ^a a 8 d EA (% Germinación)
EL16	97	97
EL17	90	83

^a La viabilidad se midió como el % de germinación de las semillas después de 7 días de imbibición a 27-29°C.

Los perfiles de RAPDs se realizaron por duplicado siguiendo un procedimiento similar al descrito para los controles. En las figuras 9, 10 y 11 se pueden observar los productos de amplificación de las secuencias EX1, ABA04 y H7, tanto de los controles como de los materiales sometidos a un EA de 4 y 8 días. El total de las bandas encontradas, tanto en los controles como de los materiales envejecidos, para las tres secuencias fue de 52 bandas. En el cuadro 11 se presentan los resultados de los RAPDs tanto de los controles, con fines comparativos, como los de 4 y 8 días de EA.

Cuadro 11. Resultados de los RAPDs de las secuencias H7, EX1 Y ABA04 que presentaron polimorfismo en control y envejecidos entre las líneas EL16 y EL17.

OLIGO-pb	EL16			EL17		
	Control	4 d EA	8 d EA	Control	4 d EA	8 d EA
H7-865	NA	-	-	-	+	+
643	NA	-	+	+	+	+
510	NA	+	-	-	+	+
330	NA	+	-	-	-	-
EX1-1414	+	-	+	-	-	-
1044	-	-	-	-	+	+
846	+	+	+	-	-	-
686	+	+	+	-	-	-
598	+	+	+	+	+	+
431	+	+	+	-	+	+
269	-	-	-	+	+	-
ABA04-1331	-	-	-	NA	+	+
604	-	+	-	NA	+	+
501	-	-	-	NA	+	+
376	+	+	+	NA	+	+
297	-	+	-	NA	+	+
237	-	+	-	NA	+	+

Los valores de pb obtenidos en este cuadro fue del promedio de las repeticiones que se realizaron. Estos valores no son exactamente iguales que los que se presentan en las figuras, debido a las variaciones que hay entre cada gel.

En ADN aislado de materiales control el oligo H7 presentó una banda polimórfica de 643 pb. La banda estuvo presente con EL17 y ausente en EL16 (Fig. 9, carril 2,3 y cuadro 11). Por el contrario EX1 mostró 6 bandas de amplificación, de éstas cuatro, 1414, 846, 686 y 431 pb, fueron polimórficas a EL17 pues en esta línea no amplificaron (Fig. 10, carril 1,2 y cuadro 11). Sorprendentemente con este oligo amplificó una banda de 269 pb en EL 17 pero no en EL16. En ABA04 se obtuvo una banda polimórfica de 376 pb en EL16 control no presente en EL17 (Fig. 11 carril 2,3 y cuadro 11).

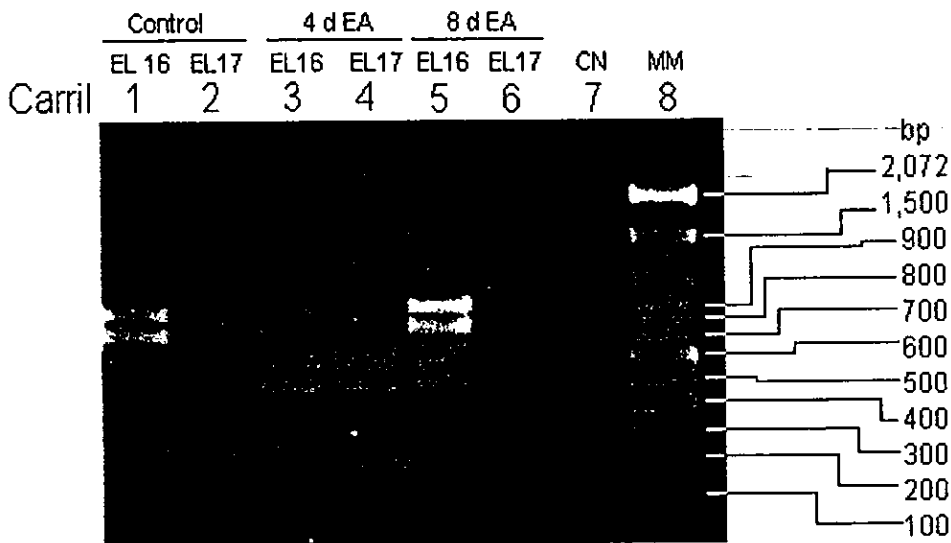


Fig. 10 Gel de ADN al 1.5% (p/v). Productos de amplificación de RAPD que presentaron polimorfismo con el oligonucleótido EX1 (5'-GTGACATAGC-3'). Carril 1, ADN de EL16 control. Carril 2, ADN de EL17 control. Carril 3, ADN de EL16 con 4d de EA (100% HR/40°C). Carril 4, ADN de EL17 con 4d de EA (100% HR/40°C). Carril 5, ADN de EL16 con 8 d EA (100% HR/40°C). Carril 6, ADN de EL17 con 8 d EA (100% HR/40°C). Carril 7, control negativo (CN), son todos los componentes para realizar el RAPD, pero sin ADN. Carril 8, Marcadores de PM (MM), de una escalera de ADN de 100 pb. El marcador cuenta con bandas desde 100 pb hasta 1,500 pb y una banda adicional de 2,072 pb.

NOTA: Los valores de pares de bases (pb) en la figura no coinciden con los del cuadro 11, debido a que los valores del cuadro se obtuvieron del promedio de pb de varios gels y a las variaciones normales que se presentan entre cada gel. Esta figura corresponde a un gel independiente.

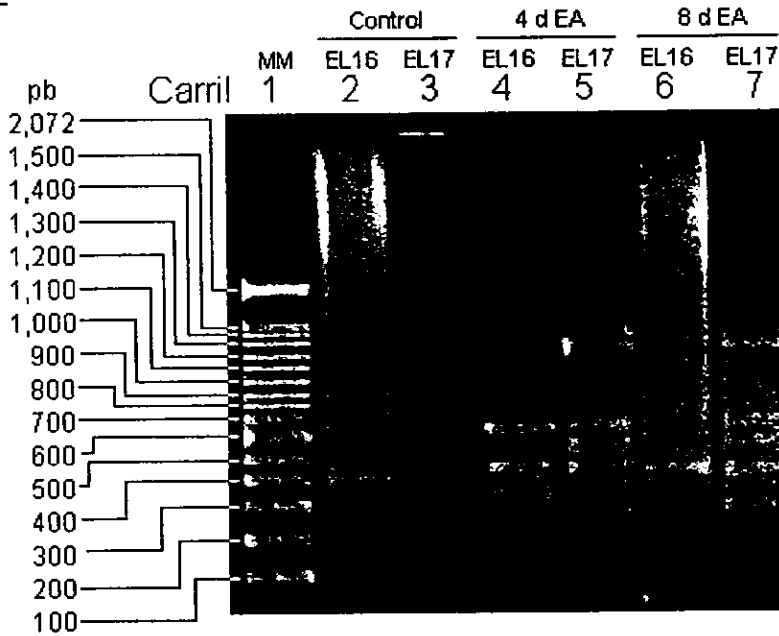


Fig. 11 Gel de ADN al 1.5% (p/v). Productos de amplificación de RAPD que presentaron polimorfismo con el oligonucleótido ABA04(5'-CACGTGACGT-3'). Carril 1, Marcadores de PM (MM) de una escalera de ADN de 100 pb. El marcador cuenta con bandas desde 100 pb hasta 1,500 pb y una banda adicional de 2,072 pb. Carril 2, ADN de EL16 control. Carril 3, ADN de EL17 control. Carril 4, ADN de EL16 con 4d de EA (100% HR/40°C). Carril 5, ADN de EL17 con 4d de EA (100% HR/40°C). Carril 6, ADN de EL16 con d EA (100% HR/40°C). Carril 7, ADN de EL17 con d EA (100% HR/40°C).

NOTA: Los valores de pares de bases (pb) en la figura no coinciden con los del cuadro 11, debido a que los valores del cuadro se obtuvieron del promedio de pb de varios gels y a las variaciones normales que se presentan entre cada gel. Esta figura corresponde a un gel independiente.

Estos siete loci polimórficos fueron estables durante el envejecimiento, es decir se detectaron independientemente del grado de envejecimiento (Fig. 9, 10 y 11, cuadro 11). Sin embargo, durante el envejecimiento el ADN se modificó, aún cuando la viabilidad no varió de forma importante (Cuadro 10). Esta modificación se reflejó como aparición de nuevas bandas en los perfiles electroforéticos de los productos de la reacción de PCR.

El número de bandas detectadas en el ADN aislado de semillas envejecidas con cada una de las secuencias polimórficas identificadas en los controles y el tiempo de envejecimiento al que se detectaron fue dependiente de cada línea. En el caso de EL16, la línea con buenas características de almacenamiento, a los cuatro días de almacenamiento se detectaron cinco nuevos locus. Dos se detectaron con H7 y tres con ABA04, de los cuales a los 8 días de EA, solo permaneció el locus H7-643 pb (Cuadro 11). Este fue el locus polimórfico detectado con EL17 control, la línea de mayor SE. Mientras que en EL17, la línea de mayor SE, el ADN sufre un mayor número de modificaciones pues se detectaron nueve nuevos locus inducidos por el envejecimiento, los cuales 5 fueron similares a los que se detectaron en EL16 y la pérdida de uno de los presentes en el control, EX1-269 pb.

Es importante hacer notar que los loci generados en los materiales envejecidos de EL17 se mantuvieron estables los 4 y 8 días de EA. Lo anterior sugiere que el ADN de EL17 fue más sensible a cambios inducidos durante el almacenamiento que EL16.

En la figura 12 se muestra el efecto que tuvo el envejecimiento sobre el ADN, en donde claramente se distingue que aumenta la degradación del ADN

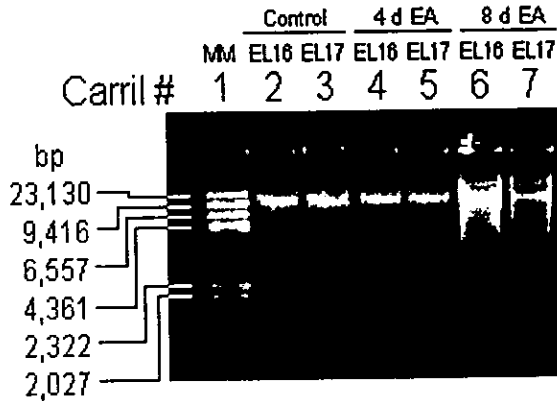


Fig. 12 Gel de ADN al 1.0%. ADN de EL16 y EL17 a diferentes períodos de EA (100% HR/40°C). Carril 1, Marcadores de PM elevado de fragmentos de λ ADN/HindIII (MM). Carril 2, ADN de EL16 control. Carril 3, ADN de EL17 control. Carril 4, ADN de EL16 con 4d EA. Carril 5, ADN de EL17 con 4d EA. Carril 6, ADN de EL16 con d EA. Carril 7, ADN de EL17 con d EA.

conforme aumentan los días de EA. Especialmente en EL17 donde a los días de EA (Fig.12, carril 7) se observan dos bandas bien definidas. En la literatura se establece que el envejecimiento es uno de los iniciadores de ERO (Fig.1), provocando daños sobre los ácidos nucleicos, como mutaciones a nivel de adición o deleción de bases en el ADN, así como otro tipo de aberraciones cromosomales al provocar rompimiento en la cromatidas (Scandalios, 1993; Smith y Berjak, 1995). Esta puede ser una de las razones de la generación y desaparición de los loci presentes en los controles. El hecho de que el envejecimiento haya inducido un mayor número de bandas en los patrones electroforéticos del ADN amplificado aislado de EL17 sugiere que el ADN de EL17 fue más sensible que el ADN de EL16. Por otro lado, los resultados de esta sección también

implican que la capacidad de reparación de los daños al ADN durante el envejecimiento fue mayor en EL16 que en EL17, ya que a los 8 días de EA, en la primera sólo permanece uno de los 5 locus inducidos por el envejecimiento y presentes a los 4 días de EA.

La importancia de encontrar un polimorfismo estable entre dos líneas de maíz es la posibilidad de que estas secuencias puedan llegar a utilizarse como marcadores moleculares, para el proceso de fitomejoramiento. De esta manera, los resultados obtenidos son el comienzo de las diferencias fenotípicas y la diversidad genética entre las dos líneas seleccionadas. Así, a través de estudios de segregación en la descendencia de la cruce de EL16 y EL17, se podría identificar el polimorfismo encontrado en los padres y evaluar el fenotipo en la descendencia. Esto sería el inicio para encontrar marcadores moleculares relacionados con el envejecimiento y la posibilidad de aplicar programas de fitomejoramiento a través de selección asistida por marcadores (SAM).

6. CONCLUSIONES

- El régimen de 85 % HR y 35°C fue el que permitió hacer una clasificación más discriminativa entre las líneas de acuerdo a su sensibilidad al envejecimiento.
- De las líneas estudiadas EL16 fue de baja sensibilidad al envejecimiento (SE). Las líneas A6,L6AV, L8BV, HS1 Y EL17, tuvieron una moderada SE. Las líneas EL21X, L3-19BV, L3-10AV, A6-21-BV y L7AV fueron de alta de sensibilidad al envejecimiento.
- De un total de 35 secuencias de oligonucleótidos probadas en EL 16 de baja sensibilidad al envejecimiento y EL17 de mediana SE, 3 secuencias presentaron polimorfismo H7, EX1 y ABA04 entre cada una de ellas.
- El RAPD detectó que EL16 posee 5 locus que están ausentes en EL17 y que EL17 posee 2 locus que no posee EL16.
- Los loci polimórficos detectados en los controles fueron estables durante el almacenamiento.
- El envejecimiento acelerado generó nuevos loci.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Bernal-Lugo I. y Leopold A.C.(1995). Seed stability during storage: Raffinose content and seed glassy state. *Seed Science Research* 5:75-80.
2. Bernal-Lugo I., Parra C., Carballo A. y Hamabata A. (1994). Enzymic systems altered by accelerated aging of seeds. *Plant Physiology*. 13:287-294.
3. Bernal-Lugo I. y Leopold A.C. (1998). The dynamics of seed mortality. *Journal of Experimental Botany*. 49(326): 1455-1461.
4. Bewley J.D. y Black M.(1994) Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination.En:Viability, dormancy and environmental control. Editorial Springer-Verlag, Berlin, Alemania.pp 388-390
5. Bolwell G.P. (1995) The origin of the oxidative burst in plants. *Biochemical Society Transactions*. 24: 438-442.
6. Bradford KJ, Tarquis AM, Duran JM. (1993). A population based threshold model describing the relationship between germination rates and seed deterioration. *Journal of Experimental Botany*. 44:1225-1234.
7. Carpita N.C. y Gibeaut D.M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal*. 3: 1-30.
8. Cortinas, E.H. (1997) Perspectivas de la biotecnología y los marcadores moleculares en el desarrollo en México. *Ciencia* . 48(3):51-56.
9. Cruzan, M.B. (1998). Genetic Markers in Plant Evolutionary Ecology. *Ecology* 79: (2)400-412.
10. Chen Z., Malamy J., Henning J., Conrath U., Sánchez-Casas P., Silva H., Ricigliano J. y Klessig D. (1995). Induction, modification, and transduction of salicylic acid signal in plant defense responses. *Proc.National Academic of Science*. 92: 4134-4137.
- 11.Dellaporta S.L., Wood J, y Hicks J.B. (1986). A Plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Report* 1:19-21.
- 12.Dexter S.T. (1966). Conditioning dry bean seed (*Phaseolus vulgaris* L) for better processing quality and seed germination. *Agronomy Journal* 58:629-631.
- 13.Ellis R.H y Roberts E.H. (1980). Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany*. 45: 13-30.
- 14.Fu Y.K., Van D.A. y Peter P.K. (1993). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology* 18:287-301.
- 15.Gale, M.D. y Witcombe, J.R. (1992) . DNA markers and marker-mediated applications in plant breeding, with particular reference to pearl millet breeding. En: Biotechnology and crop improvement in Asia. Moss, J.P. y Patancheru, A.P(eds.)

- India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. pp 323-332.
- 16.Gong M.,Yong-Jun L. y Shun-Zhong C..(1998). Abscisic Acid-induced Thermotolerance in Maize Seedlings is Mediated by Calcium and Associated with Antioxidant Systems. *Journal of Plant Physiology*. (153)488-496.
- 17.Haley, SD. Miklas, PN. Stavelly, JR. Byrum, J. y Kelly, JD.(1993). Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. *Theoretical and Applied Genetics*.86:505-512.
- 18.Helentjans, T. Slocum, M. Wright, S. Schaefer A. y Nienhuis J. (1986). Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms.*Theoretical and Applied Genetics*. 72:761-769.
- 19.Hernández R., Sierra M.P., Plasencia J., Carballo A., Azpíroz S., Smith M. e Bernal-Lugo I. (1998). Caracterización de dos poblaciones de maíz (F1) en relación a la sensibilidad al envejecimiento.XVII Congreso de Fitogenética. Acapulco, Gro. México.
- 20.Heydecker, W. (1972). Vigour. En: Viability of seeds. Roberts E.H. (eds.). Editorial Chapman and Hall, Londres, Inglaterra. pp 209-252.
- 21.Hu J. y Quiros C. (1991). Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers.*Plant Cell Reports* 10:505-511.
- 22.ISTA. (1985). International Seed Testing Association Report. *Seed Science and Technology*. 13: 299-355.
- 23.Jugenheimer R.W. (1976). CORN: Improvement, Seed Production and Uses. John Wiley & Sons Editors. USA.pp 25-38.
- 24.Knapp s. y Bridges W. (1990). Using molecular markers to estimate Quantitive Trait Locus Parameters: Power and Genetic Variances for Unreplicated Progeny. *Genetics* 16:769-777.
- 25.Knapp S. J. (1998). Marker-Assited Selection as a Strategy for Increasing the Probability of Selecting Superior Genotypes. *Crop Science*. 38:1164-1174.
- 26.Lande, R. (1991). Marker-assited selection in relation to traditional methods of plant breeding. Cap.20. En: Plant Breeding in the 1990s. Stalker, H.T. y Murphy, J.P. (eds). Editorial CAB International. pp 437-458.
- 27.Leopold C., Sun W. and Bernal-Lugo I.(1994). The glassy state in seeds: Analysis and Function. *Seed Science Research* 4:267-274.
- 28.Lindstrom E.W.(1942). Inheritance of seed longevity in maize inbreds and hybrids. *Genetics* 27:154-155.
- 29.Michelmore R.W., Paran Y., y Kesseil R.V. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. National Academic of Science*. 88: 9828-9832.
- 30.Moreno M.E.(1984). Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología. Editorial UNAM. México. pp 1-15.

31. Moreno, E. y Ramírez, J. (1987). Comportamiento de siete variedades de frijol almacenadas bajo diferentes temperaturas. *Turrialba*. 37, 155-159.
32. Phillips R. y Vasil I. (1994). DNA-based markers in plants. *Kluwer Academic Publishers*. pp 1-57.
33. Poehlman, J.M. (1994). Plant genomes, gene markers, and linkage maps. En: *Biotechnology and crop improvement in Asia*. Moss, J.P. y Patancheru, A.P(eds). India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. pp 297-322.
34. Poehlman, J.M. (1987). Mejoramiento genético de las cosechas. Editorial Limusa. Décima impresión. Mexico. pp 21-42; 260-263.
35. Powell W.(1992). Plant genomes, Gene markers and Linkage maps. En: *Biotechnology and crop improvement in Asia*. Moss, J.P. y Patancheru, A.P(eds). India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. pp 297-322.
36. Prasad T.K., Anderson M.D. y Stewart C.R. (1994). Acclimation, Hydrogen Peroxide, and Abscisic Protect Mitochondria against Irreversible Chilling Injury in Maize Seedlings. *Plant Physiology*. 105:619-627.
37. Prasad T.K., Anderson M.D., Martin B.A. y Stewart C.R.(1990) Involvement of Oxidative stress in Chilling Acclimatation in Maize Seedlings. En: *The Past, Present and Future of Plant Biology*. Joseph E. Varner Symposium. pp 82-86.
38. Priestley, D.A. (1986). Seed Aging. Editorial Comstock Publishing Associates, Ithaca, NY, USA. pp 39-75; 125-193.
39. Priestley, D.A., Cullinan, V. y Wolfe J. (1985). Differences in seed longevity at the species level. *Plant Cell an Environment*. 8:557-562.
40. Ramachandran, S. (1992). Agricultural research under conditions of biotic and abiotic stress and scarce resources. En: *Biotechnology and crop improvement in Asia*. Moss, J.P. y Patancheru, A.P(eds). India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. pp. 9-15.
41. Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (1989). Molecular cloning. A Laboratory Manual. Segunda Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
42. Scandalios J.G. (1993). Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiology*. 101:7-12.
43. Scott G.E. (1980). Improvement for Accelerated Aging response of seed in Maize Populations. *Crop Science*. 21:41-43.
44. Shatters G.R., Schweder M., West, S.H., Abdelghany A. y Smith R. (1995). Environmentally induced polymorphisms detected by RAPD analysis of soybean seed DNA. *Seed Science Research*. 5, 109-116.
45. Smith M.T. y Berjak P. (1995). Deteriorative Changes Associated with the Loss of viability of Stored Desiccation-Tolerant and Desiccation-Sensitive Seeds. En: *Seed Development and Germination*. Kigel Jaime y Galili Gad (eds). Editorial Marcel Dekker, Inc.N.Y., USA. pp. 701-746.

46. Snijder, A.J., Wastie, R.L., Glidewell S.M. y Goodman B.A. (1995). Free Radical and other paramagnetic ions in interactios between fungal pathogens and potato tubers. *Proc.National Academic of Science*. 24: 442-446.
47. Stuber, C.W. (1992). Biochemical and molecular markers in plant breeding. En: *Plant Breeding Review*. Editorial J. Wiley & Sons Inc. N.Y, USA. pp 37-61.
48. Sun, W.Q. (1997) Glassy state and seed storage stability: The WLF kinetics of seed viability loss at $T > T_g$ and the plasticization effect of water on storage stability. *Annual Review of Botany* 79:291-297.
49. Torres A.M., Weeden N.F y Martin, A.(1993). Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia Faba*. *Theoretical and Applied Genetics*. 85: 937-945.
50. Weinsinger, A.K. y Moss, J.P. (1992). A glossary of selected biotechnology terms. En: *Biotechnology and crop improvement in Asia*. Moss, J.P. y Patancheru, A.P.(eds). India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. pp 361-371.
51. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18(22): 6531-6535.
52. Williams J.G.K. , Hanafey M., Rafalski J.A. y Tingey S.V. (1993). Genetic Analysis using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology* . 218(51):704-740.
53. Williams J.G.K. , Kubelic A., Livak K., Rafalski J.A. y Tingey S.V. (1990). DNA Polymorphism Amplified by Arbitrary Primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* .18(22):6531-6535.
54. Winter P. y Kahl G. (1995). Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11: 438-448.
55. Yang X. y Quiros C. (1993). Identification and Classification of Celery cultivars with RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 86:205-212.
56. Zuber M.S. y Darrah L.L. (1987). Breeding Genetics and Seed Corn Production. En: *Corn: Chemistry and Technology*. Stanley A. Watson y Paul E. Ramstad (eds). St.Paul, Minnesota, USA. pp 37-44, 47-51.

APÉNDICE 1

MATERIALES BIOLÓGICOS

1.1 Se usaron 13 líneas de maíz (*Zea mays L.*). Las líneas fueron denominadas como: EL16, EL17, L4AV, EL21X, L7AV, L9AVE, L3-10AV, L3-19BV, A6-21-2BV, L6AV, L8BV, HS1 y A6 proporcionadas por el Dr. A. Carballo del Colegio de Posgraduados.

1.2 Se probaron 35 oligonucleótidos (Cuadro 12) con una longitud de 10 pares de bases. Estos fueron seleccionados por estar asociados con diferentes tipos de estres:

- Modificación de secuencias debido al envejecimiento durante el almacenamiento de semilla de frijol soya, (Shatters R.G., 1995).
- Secuencias seleccionadas al azar.
- Estrés xerobiótico (sequía), (Scandalios, 1993).
- Elemento de respuesta al Ácido abscísico (ABA), (Prasad *et al*, 1994; Prasad *et al*, 1990; Gong *et al*, 1998).
- Resistencia al ataque de patógenos, (Scandalios, 1993).

Cuadro 12. Nombre y secuencia del extremo 5' al 3' de los oligonucleótidos utilizados. Estos oligonucleótidos están agrupados de acuerdo a los diferentes tipos de estres a los que fueron asociados.

Envejecimiento durante el almacenamiento.	Secuencias seleccionadas al azar	Estrés Xerobiótico.
OPA02 TGCCGAGCTG	A4 AATCGGGCTG	EX1 GTGACATAGC
OPA09 GGGTAACGCC	A5 AGGGGTCTTG	EX2 GTGACAATGC
OPA10 GTGATCGCAG	A8 GTGACGTAGG	EX3 GTGACATTGC
OPA20 GTTGCGATCC	A19 CAAACGTCGG	EX4 GTGACAAAGC
OPB12 CCTTGACGCA	B15 GGAGGGTGTT	
OPC07 GTCCCGACGA	C4 CCGCATCTAC	Elemento de respuesta a ABA.
OPD01 ACCCGGAAGG	C8 TGGACCGGTG	ABA01 GCCACGTACA
OPD03 GTCGCCGTCA	C11 AAAGCTGCGG	ABA02 TACCGACATC
OPG14 GGATGAGACC	C17 TTCCCCCAG	ABA03 TACCGACATA
OPH07 CTGCATCGTG	D11 AGCGCCATTG	ABA04 CACGTGACGT
	H5 AGTCGTCCCC	
	G18 GGCTCATGTG	Resistencia al ataque de patógenos.
	I 16 TCTCCGCCT	
	H7 CTGCATCGTG	OPA14 TCTGTGCTGG
	F14 TGCTGCAGGT	OPAC20 ACGGAAGTGG

Los oligonucleótidos fueron proporcionados por la I.B. Rubí Hernández Rodríguez, los cuales fueron sintetizados en un sintetizador automatizado Pharmacia LKB Gene Assembler Special y con reactivos Pharmacia Biotech. Estos oligonucleótidos contienen un promedio de bases G+C de aproximadamente 50 % de la distribución total de la secuencia.

APÉNDICE 2

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

2.1 Envejecimiento acelerado (EA) de las semillas a diferentes regímenes.

Las semillas se sometieron a 3 diferentes regímenes de envejecimiento acelerado, los cuales fueron:

1. 100 % HR y 40°C.
2. 75 % HR (obtenida con una solución saturada de NaCl) y 30°C.
3. 85 % HR (obtenida con una solución saturada de KCl) y 35°C.

Antes de proceder tanto al tratamiento de EA como a la germinación de los controles, las semillas se trataron de la siguiente forma:

- a. Las semillas se colocaron a un acondicionamiento previo de 8 a 12 horas de 100 % de HR.
- b. Luego las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % durante 1 min.
- c. Se enjuagaron con agua destilada hasta que perdieran el olor a hipoclorito de sodio.
- d. Se dejaron secar durante 12 horas en una campana de flujo laminar.
- e. Se espolvorearon con Captan.
- f. El tratamiento de EA consistió en colocar las semillas en cajas de plástico selladas herméticamente. Las semillas no estaban en contacto directo con las soluciones que proveían las condiciones de envejecimiento.
- g. Las líneas se sometieron a diferentes períodos de tiempo para cada uno de los regímenes de envejecimiento. Los períodos de muestreo se escogieron de acuerdo a la agresividad de deterioro de cada régimen.
- h. Posteriormente las semillas envejecidas se germinaron.

NOTA: Es importante revisar periódicamente la sobresaturación de las soluciones que se utilizan para crear las condiciones de HR para cada uno de los regímenes de deterioro, debido a que una sobresaturación excesiva provoca una disminución de

la HR. También se deben mezclar las semillas para que exista una homogeneidad en su contenido de humedad.

2.2 Prueba de viabilidad

La viabilidad se cuantificó como el porcentaje de germinación de un lote de semillas a los 7 días después de iniciada su imbibición. En este trabajo se consideró que una semilla había germinado cuando la radícula había roto la testa y crecido cuando menos 3 mm. Esta prueba nos permitió establecer una clasificación del poder germinativo entre las diferentes líneas de semillas de una misma especie (Moreno E, 1984) y se realizó tanto para semillas control como para semillas envejecidas.

- a. Para pruebas iniciales se emplearon lotes de 10 semillas por triplicado y posteriormente se utilizaron lotes de 35 semillas por triplicado.
- b. Para la germinación se utilizaron toallas absorbentes, las cuales se humedecieron con agua, quitándoles el exceso de ésta. Las semillas se colocaron entre dos toallas absorbentes humedecidas y se enrollaron. Estos rollos fueron introducidos en bolsas de plástico y se colocaron en charolas de germinación.
- c. Las semillas se germinaron por un período de 7 días a 27-29°C.
- d. Se consideraron como semillas germinadas una vez que la radícula protuyó 3 mm. No se consideraron las semillas contaminadas de hongos.

2.3 Determinación del contenido de humedad inicial de las semillas.

- a. Se colocó aproximadamente 1 g de semillas de cada línea en pesafiltros abiertos de peso conocido y se colocaron por 24 horas en un horno a 110°C.
- b. Se sacaron los pesafiltros y se transfirieron a un desecador por un lapso de 45 a 60 min. para que llegaran a temperatura ambiente.
- c. Los pesafiltros fueron pesados en una balanza.
- d. Se volvieron a introducir al horno por otras 24 horas y se volvió a repetir desde el paso b hasta que tuvieran un peso constante.

e. Calcular el contenido de humedad de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = \frac{\text{Peso fresco de la semilla} - \text{Peso seco de la semilla}}{\text{Peso fresco de la semilla}} \times 100$$

APÉNDICE 3

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

3.1 Aislamiento y purificación de ADN genómico.

El primer paso del procedimiento involucra el rompimiento de las paredes y membranas celulares para la liberación de los constituyentes celulares en un buffer de extracción (Dellaporta, 1986). Los problemas en el aislamiento del ADN, específicamente de plantas, son la presencia de la actividad de ADNasa y de otras macromoléculas que son aisladas simultáneamente durante el proceso de purificación. El problema de la nucleasas es reducido mediante la remoción de cationes tales como el Mg^{2+} que se necesitan para la actividad de las mismas, utilizando EDTA. Además detergentes como SDS son frecuentemente utilizados para inhibir las actividades de las enzimas y también disocian las proteínas del ADN, que junto con las altas concentraciones de sales forman un complejo soluble (Citado en Sambrook *et al*, 1989). Posteriormente, un decremento en la concentración de sales causa la precipitación de ADN separándose de otros componentes, especialmente de polisacáridos en solución (Citado en Sambrook *et al*, 1989). Es importante que el ADN esté completamente libre de impurezas porque pueden inhibir reacciones enzimáticas posteriores.

El procedimiento seguido fue:

- a. Acondicionamiento de semillas por 12 hrs.
- b. Lavado de semillas con solución de hipoclorito de sodio al 2 %.
- c. Germinación de semillas en toallas de papel por tres días a una temperatura de 27 a 29°C.
- d. Siembra en tierra y desarrollo de la plántula por 12 días en obscuridad.
- e. Se pesaron 2.5 g de tejido vegetativo etiolado proveniente de 30 plantas y se trituró con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. La finalidad de este paso fue la de romper las paredes celulares para facilitar la salida del ADN.

- f. El tejido pulverizado se transfirió a un tubo corex de 25 mL agregándosele 20 mL de buffer de extracción (Tris-HCl 0.1 M (pH 8), EDTA 50 mM (pH 8), NaCl 0.5 M, de β -mercaptoetanol 10 mM y SDS al 10%). Se mezcló suavemente y se incubó por 10 min. a 65°C, mezclando ocasionalmente de manera suave. Este paso es para lograr una buena separación entre las proteínas y el ADN.
- g. Se adicionaron 6.6 mL de acetato de potasio 5 M mezclando suavemente. La muestra se incubó 30 min. en hielo. En este paso, las proteínas se precipitan totalmente lográndose su separación del ADN.
- h. La muestra se centrifugó a 13 000 r.p.m. y 4°C durante 30 min.
- i. El sobrenadante se filtró a través de un filtro milipore colectándose en un tubo estéril que contenía 20 mL de alcohol isopropílico frío (-20°C). Una vez recuperado el volumen total se mezcló cuidadosamente y se incubó a -20°C por 30 min.
- j. Se colectó el ADN precipitado en la solución con una pipeta Pasteur en forma de gancho, teniendo cuidado de mantener la integridad del mismo, se transfirió a un tubo de microcentrífuga conteniendo 700 μ l de solución TE (Tris-HCl 50 mM (pH 8) y EDTA 10 mM (pH 8)).
- k. Se agregaron 4 μ l de ARNasa y se incubó a 37°C por 30 min, para la eliminación del ARN.
- l. Fueron adicionados al tubo 75 μ l de acetato de sodio 3 M y 500 μ l de alcohol isopropílico, se mezcló cuidadosamente y se incubó la muestra a -20°C durante dos horas.
- m. Se centrifugó la muestra a 3000 r.p.m. por 10 min desechando el sobrenadante, la pastilla se lava varias veces con alcohol etílico al 70%. Posteriormente se dejó secar y se resuspendió en 50 a 100 μ l de agua estéril dependiendo del tamaño de la pastilla.
- n. Se recomienda separar el ADN en alícuotas pequeñas y almacenarlas a -20°C. De forma adicional, hacer varias diluciones de pequeños volúmenes (10 a 15 μ L) para utilizarlos en los RAPDs, almacenar a -20°C y sólo descongelar una sola vez.

En caso que la pastilla de ADN, colectada en el paso j presentara contaminantes de color blanco, se realizó un paso adicional de lavado con fenol: cloroformo, posterior a la adición de los 4 μL de ARNasa. Cabe aclarar que la ARNasa puede actuar en la presencia de estos contaminantes, que en su mayoría son carbohidratos.

1. Se adicionó a la muestra igual volumen de fenol-cloroformo 1:1 agitando suavemente, se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 min.
2. En el tubo se observó la formación de dos fases, la fase superior (acuosa) se transfirió cuidadosamente a otro tubo. Se repitió la operación del paso 1.
3. Posteriormente al volumen recuperado se le adicionó el 10 % de su volumen de acetato de sodio y el doble del volumen total de alcohol etílico. Esta mezcla se incubó a -20°C por 2 horas.
4. Se centrifugó la muestra a 3000 r.p.m. por 10 min. desechando el sobrenadante, la pastilla se lavó varias veces con alcohol etílico al 70 %.
5. Posteriormente se dejó secar y se resuspendió en 50 a 100 μL de agua estéril dependiendo del tamaño de la pastilla.

NOTA : Todo el material de vidrio utilizado se lavó con H_2SO_4 y posteriormente se esterilizó a $15 \text{ kg/cm}^2 / 121^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos.

3.2 Determinación de la calidad del ADN aislado por electroforesis en minigel de agarosa.

El grado de degradación del ADN puede ser estimado por la electroforesis de una alícuota de la muestra en minigeles de agarosa. El ADN de peso molecular alto se observa como banda bien definida, mientras que el material parcialmente degradado, forma un barrido a lo largo del carril. Algunas veces el ADN aislado puede estar contaminado con otras sustancias que absorben la radiación UV e impiden el análisis correcto (Citado en Sambrook *et al*, 1989). La localización del ADN dentro del gel se realiza directamente al teñirlo con Bromuro de etidio. Este

es un colorante fluorescente que contiene un grupo plano que se intercala entre los ácidos nucleicos y su cercanía a las bases permite que el ADN se observe con una fuente de UV. La movilidad electroforética del ADN se ve afectada por la composición y capacidad iónica del amortiguador de electroforesis (Sambrook et al, 1989). El amortiguador utilizado fue el TAE (Tris acetato) que se utilizó a una concentración de 1X.

Cuadro 13. Características del amortiguador utilizado para la electroforesis.

Amortiguador	Solución de Trabajo	Solución stock (por Litro)
TAE (Tris acetato)	1X : 0.04 M Tris-acetato 0.001 M EDTA	50X : 242 g Trisbase 57.1mL de Ác. acético glacial. 100mL de EDTA 50 mM(pH8)

De esta manera, cuando un campo eléctrico es aplicado a través del gel de ADN, el cual está cargado negativamente a pH neutro, migra hacia el ánodo. El voltaje recomendado a aplicar es de 5 V / cm. El procedimiento para preparar el gel fue el siguiente:

- a. Se sellaron los extremos del portageles con los toques de la cámara de electroforesis y se insertó el peine.
- b. Se preparó un gel de agarosa de 1.0 % (P/V) preparado con buffer TAE 1X.
- c. Se calentó el buffer con la agarosa en un horno de microondas hasta la disolución total de la agarosa, se añadió bromuro de etidio de una solución stock de 10 mg / mL para llegar a una concentración final de 0.5 µg / mL y se mezcló perfectamente.
- d. Se dejó enfriar hasta aproximadamente 60°C y se vació con cuidado a los portageles para tener una altura de 3 mm a 5 mm y se revisó que no hubiera burbujas a lo largo del gel y entre los dientes del peine. Se esperó de 45 min. a 1 hora para que solidificara.
- e. Se cubrió el gel con el amortiguador TAE y se removió el peine.

f. A cada muestra de ADN se le adicionó 1/10 del volumen del amortiguador de carga y se mezcló. El amortiguador de carga ayuda de dos formas: (1) contiene glicerol que hace a la muestra más densa que el amortiguador TAE permitiendo que la muestra se quede en el fondo del pozo y (2) debido a su color, es posible seguir el movimiento de las muestras de ADN (Citado en Sambrook *et al*, 1989). La composición del amortiguador de carga es:

6X Amortiguador de carga
0.25 % de azul de bromofenol
0.25 % xileno cianol FF
30 % (v/v) de glicerol en agua
Temperatura de almacenamiento 4°C

g. Se colocaron las muestras de ADN, evitando derramarlas en pozos adyacentes. En el último pozo se colocó un marcador de alto peso molecular, ADN de Lambda cortado con Hind III.

h. Se colocó la tapa y se colocaron los electrodos. Se corrió a 38 V durante 1.5 horas.

i. Se retiró el gel y se observó sobre un transiluminador de UV y se fotografió usando una cámara Polaroid con rollo 667.

PRECAUCIÓN: El bromuro de Etidio es carcinogénico y mutagénico así que se debe manejar con cuidado. Se deben usar guantes y almacenar en frascos ámbar o cubrirlo con papel aluminio para evitar el paso de luz. Varios protocolos describen como inactivar esta sustancia, para posteriormente desecharla (Sambrook *et al*, 1989). La luz UV es dañina al exponer los ojos y la piel. Se deben usar en todo momento anteojos especiales o caretas de protección y bata de laboratorio.

3.3 Cuantificación del ADN.

Existen dos métodos para cuantificar ADN:

1. Por medición espectrofotométrica, es simple y exacta cuando la muestra es pura (sin cantidades significantes de contaminantes, tales como proteínas, fenoles, agarosa u otros ácidos nucleicos).
2. Intensidad fluorescente emitida por el Bromuro de etidio, es útil si se tienen cantidades bajas o con contaminantes.

Se realizó la lectura espectrofotométrica para calcular la cantidad de ADN. Las lecturas se hicieron a 260 nm y a 280 nm. La lectura a 260 nm permite el cálculo de la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. Una DO de 1 corresponde a una concentración aproximada de 50 µg / mL de ADN de doble hélice y de 40 µg / mL de ADN sencillo. La relación entre las lecturas a 260 nm y a 280 nm (DO_{260} / DO_{280}) provee una estimación de la pureza del ácido nucleico. Preparaciones puras de ADN o ARN tienen una DO_{260} / DO_{280} de valores de 1.8 a 2.0, respectivamente. Si existe contaminación de proteínas o fenoles, el valor de la relación puede reducirse significativamente (Sambrook, *et al* 1989).

a. Agregar 3 µL de la muestra patrón de ADN a 297 µL de agua estéril. Mezclar perfectamente y leer la absorbencia en el espectofotómetro a 260 y 280 nm, utilizando celdas de cuarzo de 500 µL.

b. Calcular la concentración de ADN en la solución de acuerdo a la siguiente fórmula:

Concentración del ADN (µg / µL) = ($DO_{260} \times 50 \mu\text{g} / \text{mL} \times \text{factor de dilución} \times \text{Volumen de resuspensión en mL}$) / Volumen de resuspensión en µL.

3.4 Técnica de Amplificación no específica del ADN polimórfico (RAPDs).

Esta es una técnica novedosa para la identificación de polimorfismo de ADN. Se basa en la amplificación del ADN, donde no se requiere un conocimiento previo de la secuencia blanco del ADN utilizado. Los marcadores RAPDs se generan con la amplificación de segmentos de ADN utilizando un solo iniciador con una secuencia arbitraria de oligonucleótidos. El polimorfismo se detecta de forma simple como secuencias de ADN que amplifican en un progenitor pero no en el otro. Los marcadores RAPDs se pueden utilizar para mapeo genético así como para diagnósticos genéticos. El ensayo no es radioactivo, requiere de bajas cantidades de ADN y es aplicable a un amplio rango de especies. En el cuadro 14 se compara el RFLP con los RAPDs, ambas técnicas identifican el polimorfismo del ADN (Williams J.G.K. *et al*, 1990).

Cuadro 14. Comparación entre RFLP y RAPDs.

Características	RAPDs	RFLP
Dominancia	Dominante	Codominante
Ensayo	Amplificación de ADN	Hibridación en blot de ADN
Detección	Fluorescencia	Isótopos radioactivos
Cantidad de ADN requerida	25 ng	2 - 10 µg

Procedimiento:

a. El volumen de cada reacción fue de 25 µL conteniendo: 2.5 µl Buffer 10X sin Mg²⁺ (Gibco BRL), 0.5 µl de mezcla dNTP 10 mM, 0.75 µl de MgCl₂ 50 mM, 3 µl de oligonucleótido 10µM, 100 a 150 ng de ADN, 0.2 µL (1U) de taq DNA polimerasa (Gibco BRL) y agua estéril c.b.p un volumen de 25 µl. Se mezcló perfectamente.

Cuadro 15. Concentraciones finales en la mezcla de reacción

Componentes de la mezcla de reacción	Concentración final
Buffer 10X de PCR sin Mg	1X
Mezcla de dNTP 10mM	0.2 mM
MgCl ₂ 50mM	1.5 mM
Oligonucleótido 10µM	0.5 µM
ADN Taq Polimerasa (5 U / µL)	1 u
ADN muestra	100 a 150 ng por reacción
Agua estéril	c.b.p. 25 µL

b. Se preparó un control negativo (sin DNA) para cada oligonucleótido usado.

c. La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador Gene Amp® PCR System 9700 PE programado para 45 ciclos en donde se incluye desnaturalización, alineamiento y elongación (Cuadro 16).

Cuadro 16. Condiciones utilizadas para los RAPDs.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Desnaturalización inicial	94	2
Desnaturalización	94	1
Alineamiento del oligonucleótido	37	1
Elongación de la cadena	72	2
Elongación final	72	7

d. Los productos amplificados se guardaron a 4°C (máximo una semana), previo a la separación electroforética . Para almacenar por períodos más largos (más de una semana) se recomienda almacenarlos a -20°C.

e. Para un mayor número de reacciones fue conveniente preparar una mezcla de reacción general. De esta forma, se minimizó la pérdida de reactivos y se disminuyeron errores, debido al pipeteo y a la posible contaminación de los reactivos. Es de suma importancia trabajar en condiciones de alta esterilidad.

3.5 Separación de los productos amplificados.

La electroforésis a través de geles de agarosa es un método estándar utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. Es una técnica sencilla, rápida y capaz de separar fragmentos de ADN que no podrían ser separados de una forma adecuada por otros procedimientos. Los geles de agarosa tienen un poder de resolución desde 200 pb hasta 50Kb de largo en la que pueden ser separados en agarosa a diferentes concentraciones (Cuadro 17).(Sambrook et al., 1989).

Cuadro 17. Espectro de resolución efectiva de fragmentos de ADN de acuerdo a la concentración de agarosa utilizada.

% Agarosa (p/v)	Espectro de resolución efectiva de fragmentos lineales de ADN (Kb)
1.0	0.5 a 10
1.2	0.4 a 6
1.5	0.2 a 3
2.0	0.1 a 2

Se realizó el mismo procedimiento como en lo especificado en el método 3, pero con las siguientes modificaciones:

a. Se preparó un gel de agarosa de 1.5 % (p/v) preparado con buffer TAE 1X. Se prosiguió como está descrito en el apartado 3.c.

b. Se colocaron 10 μ L de cada producto de amplificación, evitando derramarlas en pozos adyacentes. En el último pozo se colocó un marcador molecular, ϕ X174 Hae III que va de 1300 pb a 100 pb o también se utilizó un marcador de ADN en escalera de 100 pb de 1500 pb hasta 100 pb.

3.6 Selección de los oligonucleótidos que presentaron polimorfismo.

Los fragmentos se seleccionaron en base a la presencia y ausencia de estos en las dos líneas de maíz utilizadas. Posteriormente los oligonucleótidos que generaron fragmentos polimórficos en estas líneas se utilizaron para evaluar el posible polimorfismo en el ADN de plántulas germinadas por 12 días provenientes de semillas envejecidas a 100 % de HR y 40°C durante 4 y 8 días. Se hicieron 3 repeticiones de cada reacción y solo los productos reproducibles fueron considerados.

3.7 Nomenclatura de los Productos de Amplificación.

Los productos de amplificación de los oligonucleótidos que presentaron polimorfismo se nombraron con el nombre del oligonucleótido utilizado seguido por el tamaño en pb de la banda que amplificó.