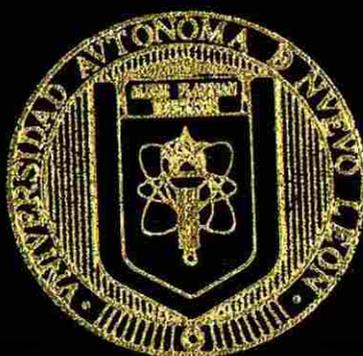


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



IDENTIFICACION DE MARCADORES MOLECULARES
Y DE REGIONES GENOMICAS QUE CONTROLAN
CARACTERES CUANTITATIVOS EN SORGO
PARA GRANO

Sorghum bicolor (L.) Moench

Por:

ADRIANA GUTIERREZ DIEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS AGRICOLAS

NOVIEMBRE 2002

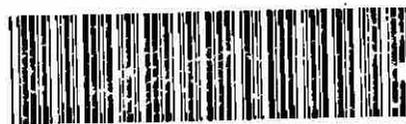
TD

Z5071

FA

2002

.G8



1020148419



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

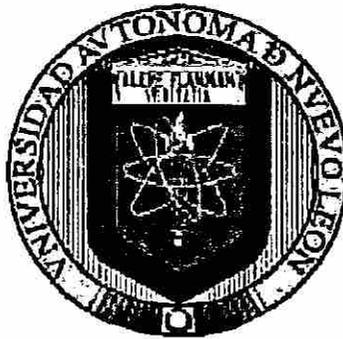
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

m

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMIA

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**IDENTIFICACION DE MARCADORES MOLECULARES Y DE REGIONES
GENOMICAS QUE CONTROLAN CARACTERES CUANTITATIVOS EN SORGO
PARA GRANO**

***Sorghum bicolor* (L.) Moench**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ADRIANA GUTIERREZ DIEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

Noviembre, 2002

974810

TD
Z5071
FA
2002
.G8



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



FONDO
TESIS

**IDENTIFICACION DE MARCADORES MOLECULARES Y DE REGIONES
GENOMICAS QUE CONTROLAN CARACTERES CUANTITATIVOS EN SORGO
PARA GRANO**

***Sorghum bicolor* (L.) Moench**

Aprobación de la Tesis:



**Ph.D. Gilberto E. Salinas García
Asesor Principal**

**Ph.D. Francisco Zavala García
Asesor**

**D.C. Ma. Elizabeth Cárdenas Cerda
Asesor**

**Ph.D. Emilio Olivares Saénz
Asesor**

**D.C. Juan Manuel De La Fuente Martínez
Asesor Externo**

**Ph.D. Ciro G.S. Valdés Lozano
Subdirector de Estudios de Postgrado**

RESUMEN

Adriana Gutiérrez Díez

Fecha de Graduación: Noviembre, 2002

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Agronomía

Título del Estudio: IDENTIFICACION DE MARCADORES MOLECULARES Y DE REGIONES GENOMICAS QUE CONTROLAN CARACTERES CUANTITATIVOS EN SORGO PARA GRANO *Sorghum bicolor* (L.) Moench

Número de páginas: 124

Candidato para el grado de
Doctor en Ciencias Agrícolas

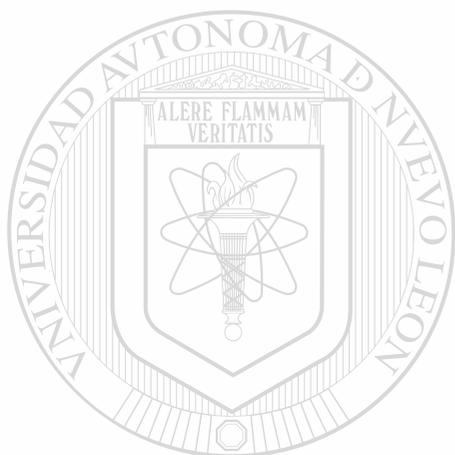
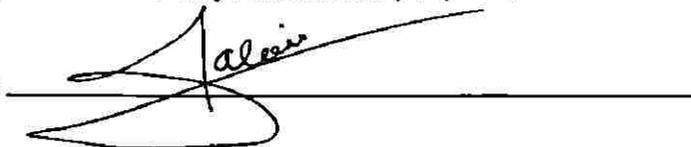
Área de Estudio: Ingeniería Genética Aplicada al Mejoramiento de Plantas

Propósito y Método del Estudio: A pesar de que el sorgo es un cultivo de importancia económica tanto a nivel nacional como internacional, su caracterización genética es limitada. Los mapas de ligamiento genético desarrollados en este cultivo son relativamente pocos, si se compara con otros cultivos como maíz o tomate. Los mapas de ligamiento genético juegan un papel importante en el mejoramiento de plantas permitiendo identificar regiones del genoma relacionadas con caracteres de importancia agronómica (QTL) que pueden ser utilizadas en combinación con los métodos tradicionales de mejoramiento (selección asistida por marcadores). En la FAUANL existe un gran interés en la localización de QTL responsables del rendimiento en sorgo, con base a esto, se planteó la localización de QTL para los caracteres: altura de planta, excersión, longitud de panoja, días a floración, días a madurez fisiológica y rendimiento por planta. Se evaluó una población de familias F_3 derivadas de la cruce de 22830 X SJ7, en los ciclos de Verano-Otoño 1997 y Primavera-Verano 1998. De éstas familias se obtuvieron los datos fenotípicos y datos moleculares mediante la generación de RFLP y SSR. Fue necesario modificar las técnicas de laboratorio para la generación de estos marcadores moleculares, a las condiciones de los laboratorios de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Contribuciones y Conclusiones: Con la segregación de 20 marcadores moleculares (10 RFLP y 10 SSR) se construyeron dos grupos de ligamiento. El grupo de ligamiento 1 se formó con los marcadores SvPEPCAAa-SvPEPCAAb. El grupo de ligamiento 2 se formó con los marcadores UMC53-UMC157, éstos han sido reportados en maíz ligados a altura de planta, número de hileras por mazorca y longitud de mazorca. Se localizaron QTL para altura de planta y días a madurez fisiológica. Ambos QTL se encontraron en el grupo de ligamiento 2. El QTL para longitud de panoja se detectó con un valor LOD de 2.30 y es responsable del 36.5% de la variación del carácter mientras que el QTL para días a madurez

fisiológica se detectó con un valor LOD de 10.10 y explica el 87.1% de su variación. Asimismo se identificaron marcadores ligados a los caracteres de altura de planta, días a floración y rendimiento por planta.

FIRMA DEL ASESOR:



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

SUMMARY

Adriana Gutiérrez Díez

Date graduation: November, 2002

Universidad Autónoma de Nuevo León

Agronomy School

Title: IDENTIFICATION OF MOLECULAR MARKERS AND QUANTITATIVE TRAIT LOCI IN SORGHUM *Sorghum bicolor* (L.) Moench

Number of pages: 124

**Candidate for the degree of
Doctor in Agricultural Science**

Subject: Genetic Engineering in Plant Improvement

Objectives and Methods: Although the sorghum is an important economic national and international crop, its genetic characterization is limited. The sorghum linkage maps are few, in comparison with the maize and tomato maps. The linkage maps play an important role in plant breeding because allow mapping quantitative traits loci (QTL), this QTL can be used in combination with traditional breeding methods in molecular assisted selection programs. The FAUANL has a big interest in mapping quantitative traits correlated with yield. The objective of this research was: mapping QTL for plant height, excersion, panicle length, days to flowering time, days to physiological maturity, and yield per plant. F₃ families from SJ7 X 22830, were tested in two seasons: Autumn-Winter 1997 and Spring-Summer 1998. Molecular data were generated using the RFLP and SSR protocols.

Contribution and Conclusions: Two linkage groups were building with 20 molecular markers (10 RFLP y 10 SSR). The markers SvPEPCAAa-SvPEPCAAb are in the linkage group 1, markers UMC53-UMC157 are in the linkage group 2. QTL for panicle length and days to maturity were mapping. These QTL are in the linkage group 2, the UMC53 and UMC157 molecular markers were reported linked in maize to plant height, kernel row number and ear height. QTL for panicle length (LOD 2.30) explain 36.5% of the character variation, QTL for days to maturity (LOD 10.10) explain the 87.1% of the variation. Molecular markers linked to these and other characters: plant height, days to flowering time and yield per plant were also identified.

MAIN ADVISOR SIGNATURE:



INDICE

INDICE DE CUADROS	ix
INDICE DE FIGURAS	xi
INDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE	xii
NOMENCLATURA	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Utilidad de los mapas de ligamiento genético	5
2.2 Marcadores genéticos	6
2.2.1 Definición	6
2.2.2 Polimorfismo	6
2.2.3 Marcadores morfológicos	7
2.2.4 Marcadores moleculares	7
2.2.4.1 Isoenzimas	9
2.2.4.2 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	9
2.2.4.2.1 Sondas	12
2.2.4.2.2 Sondas UMC (University of Missouri-Columbia)	13
2.2.4.2.3 Etiquetado de sondas	14
2.2.4.3 Marcadores basados en la PCR	16
2.2.4.3.1 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	17
2.2.4.3.2 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	20
2.2.4.3.3 STS (Sequence-Tagged Sites)	22
2.2.4.3.4 Microsatélites ó SSR (Simple Sequences Repeat)	23
2.2.5 Selección de marcadores moleculares	26
2.2.6 Número de marcadores moleculares	29
2.3 Construcción de mapas de ligamiento genético	30
2.3.1 Tipos de población	30
2.3.1.1 Poblaciones F ₂	31
2.3.1.2 Poblaciones de retrocruza	31
2.3.1.3 Poblaciones de líneas endogámicas recombinantes	32
2.3.1.4 Poblaciones de líneas dihaploides	33
2.3.2 Progenitores	33
2.3.3 Tamaño de población	34
2.3.4 Análisis de loci	35
2.3.4.1 Segregación	36
2.3.4.2 Ligamiento genético	37
2.3.4.2.1 Fases de ligamiento	38

2.3.4.2.2 Métodos matemáticos para detectar ligamiento	38
2.3.5 Construcción de grupos de ligamiento	39
2.3.5.1 Distancia genética y frecuencia de recombinación	39
2.3.5.2 Funciones de mapeo e interferencia	41
2.3.6 Programas computacionales para el análisis de los loci y construcción de mapas de ligamiento genético	43
2.3.6.1 MapMaker	44
2.3.6.2 JoinMap	45
2.3.6.3 PGRI	45
2.4 Localización de QTL (Quantitative Trait Loci ó loci de carácter cuantitativo)	46
2.4.1 Definición de QTL	46
2.4.2 Diseños experimentales y métodos estadísticos para localización de QTL	47
2.4.2.1 Análisis de regresión (análisis de marcador individual)	48
2.4.2.2 Método localización por intervalo	48
2.4.2.3 Mapeo de QTL múltiples	50
2.4.3 Programas para localización de QTLs	51
2.4.3.1 MapMaker/QTL	51
2.4.3.2 QLTCartographer	52
2.4.3.3 QGene	53
2.4.3.4 MapManager QT	53
2.5 Mapas de sorgo	54
3. MATERIALES Y METODOS	58
3.1 Etapa de campo	58
3.2 Etapa de laboratorio	59
3.2.1 Colecta del material vegetal	59
3.2.2 Extracción y cuantificación de DNA	60
3.2.3 Generación de marcadores tipo RFLP	60
3.2.3.1 Digestión y electroforesis del DNA genómico de sorgo con endonucleasas	60
3.2.3.2 Recuperación y etiquetado de sondas	61
3.2.3.3 Hibridaciones	62
3.2.4 Generación de marcadores tipo SSR o Microsatélites	63
3.3 Análisis de datos fenotípicos	64
3.4 Análisis de datos moleculares (construcción del mapa de ligamiento genético y localización de QTL)	64
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
4.1 Etapa de laboratorio	66
4.1.1 Extracción de DNA	66
4.1.2 RFLP	68
4.1.3 SSR	74
4.2 Mapa de ligamiento genético	75
4.3 Análisis de QTL	81
4.3.1 Datos fenotípicos	86
4.3.1.1 Altura de planta	87

4.3.1.2	Excursión	93
4.3.1.3	Longitud de panoja	95
4.3.1.4	Días a floración	97
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	101
6.	BIBLIOGRAFÍA	106
7.	APÉNDICE	112
	Protocolo 1. Aislamiento de DNA método del CTAB	112
	Protocolo 2. Aislamiento de DNA genómico	112
	Protocolo 3. Cuantificación de DNA por el método del fluorimetría (fluorímetro TKO 100)	113
	Protocolo 4. Digestión de DNA	114
	Protocolo 5. Electroforesis en geles de agarosa	114
	Protocolo 6. Etiquetado con digoxigenina del marcador de peso molecular λ -HindIII	115
	Protocolo 7. Transferencia de DNA a membranas (Southern blotting)	116
	Protocolo 8. Cultivo de bacterias en agar LB y medio líquido LB	117
	Protocolo 9. Mini-preps de plásmidos	117
	Protocolo 10. Etiquetado de sondas con digoxigenina por PCR	118
	Protocolo 11. Método para detectar la incorporación de digoxigenina en sondas	119
	Protocolo 12. Hibridación y detección de sondas etiquetadas con digoxigenina	119
	Protocolo 13. Remoción de las sondas de las membranas para su reuso	120
	Protocolo 14. Microsatélites (SSR)	121



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

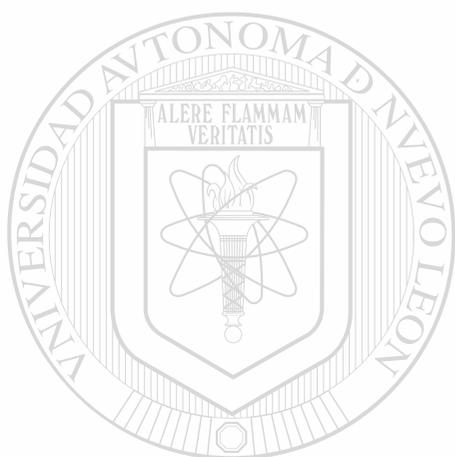


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE DE CUADROS

CUADRO	TITULO	PAGINA
Cuadro 1	Características principales de los diferentes tipos de marcadores moleculares	27
Cuadro 2	Rango de segregación esperado de los marcadores en diferentes tipos de población (CIMMYT, 1996)	36
Cuadro 3	Valores esperados de segregación entre dos loci marcadores en varias poblaciones (CIMMYT, 1996)	39
Cuadro 4	Cálculo de la varianza (renglón superior) y error estándar (renglón inferior) para diferentes frecuencias de recombinaciones (r) y tamaños de población (N)	41
Cuadro 5	Fracciones de recombinación (r) convertidas a distancias Genéticas (cM) utilizando las funciones de Haldane y Kosambi	43
Cuadro 6	Programas computacionales para el análisis de loci y construcción de mapas de ligamiento genético	44
Cuadro 7	Programas computacionales disponibles para la localización de QTL	52
Cuadro 8	Mapas de sorgo publicados	57
Cuadro 9	Concentraciones de DNA de los progenitores y de algunas familias ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) obtenidas en dos etapas de desarrollo y con dos métodos de extracción.	67
Cuadro 10	Concentraciones de DNA de algunas familias ($\mu\text{g}/\mu$) obtenidas con edades diferentes del tejido vegetal. Método modificado del CTAB (Protocolo 1)	68
Cuadro 11	Sondas utilizadas para la selección con los progenitores. El tamaño de banda y número de cromosoma corresponden al maíz	71
Cuadro 12	Resumen de las sondas que detectaron polimorfismos. El grupo de ligamiento se refiere a su localización en sorgo	73
Cuadro 13	Iniciadores utilizados en la generación de SSR, secuencias de cada par, temperatura de alineación y rango del tamaño de las bandas producido en cada progenitor	75
Cuadro 14	Valores χ^2 de la segregación de los marcadores moleculares. Los valores χ^2 de tabla para $\alpha = 0.01, 0.05$ y 0.10 con dos grados de libertad son $0.02, 0.10$ y 0.21 , respectivamente	77
Cuadro 15	QTL identificados en la población de familias F_2 (SJ7 X 22830). El LOD utilizado en la identificación de los QTL fue de 2.0 para la longitud de panoja y 4.0 para días a madurez fisiológica	82
Cuadro 16	QTL identificados por análisis de marcador individual con un nivel $\alpha = 0.05$. Los QTL y marcadores con negritas son los que se conservan cuando el análisis se realizó con $\alpha = 0.01$	85
Cuadro 17	Cuadrados medios y significancias de las fuentes de variación de las variables medidas en los ciclos Otoño-Invierno 1997 y Primavera-Verano 1998	87
Cuadro 18	Comparación de medias de las familias dentro de bloques para la variable altura de planta en el ciclo Otoño-Invierno 1997	88
Cuadro 19	Comparación de medias de las familias dentro de bloques para	

	la variable altura de planta en el ciclo Primavera-Verano 98	91
Cuadro 20	Comparación de medias de las familias dentro de bloques para la variable excursión en el ciclo Otoño-Invierno 1997	93
Cuadro 21	Comparación de medias de las familias dentro de bloques para la variable longitud de panoja en el ciclo Primavera-Verano 1998	96
Cuadro 22	Comparación de medias de las familias dentro de bloques para la variable días a floración en el ciclo Otoño-Invierno 1999	98
Cuadro 23	Comparación de medias de las familias dentro de bloques para la variable días a floración en el ciclo Primavera-Verano 1998	99



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



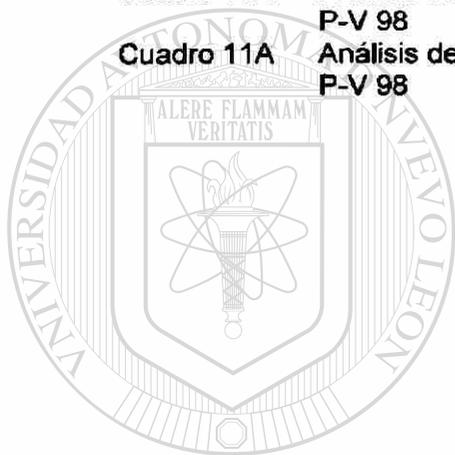
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	TITULO	PAGINA
Figura 1	Representación esquemática de la generación de RFLP	10
Figura 2	Representación esquemática de la generación de AFLP (modificado de Staub <i>et al.</i> 1996)	18
Figura 3	Representación esquemática de la generación de RAPD	21
Figura 4	Representación esquemática de la generación de STS	23
Figura 5	Representación esquemática de la generación de SSR	25
Figura 6	Autoradiografía de membranas de los progenitores, cada cinco carriles es una membrana hibridada con diferente sonda, el primer carril de cada una corresponde al marcador de peso molecular λ -HindIII etiquetado con digoxigenina-dUTP. Los carriles 1 corresponden a 22830, los carriles 2 corresponden a SJ7. El DNA fue digerido con <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> . La concentración de las sondas fue de 2.5 y 5% de digoxigenina-dUTP	69
Figura 7	Grupos de ligamiento formados y localización de QTL. El grupo de ligamiento 1 (gl. 1) se formó con un LOD de 3.0 y 2.0 mientras que el grupo de ligamiento 2 (gl. 2) se formó solamente con este último. A la izquierda se encuentran los nombres de los marcadores y a la derecha la longitud de los grupos de ligamiento, posición de los QTL (ambos en cM) y los nombres de los QTL	79
Figura 8	Gráfica de LOD QTL para la longitud de panoja La distancia en cM corresponde a la distancia entre los marcadores umc53-umc157 del grupo de ligamiento 2. El umbral del LOD es 2.0.	83
Figura 9	Gráfica de LOD QTL para los días a madurez fisiológica. La distancia en cM corresponde a la distancia entre los marcadores umc53-umc157 del grupo de ligamiento 2. El umbral del LOD es 4.0	83
Figura 10	Distribución de frecuencias para la variable altura de planta en el ciclo Otoño-Invierno 1997. Los valores de la media y la mediana son de 94.85 y 96.55 cm, respectivamente	90
Figura 11	Distribución de frecuencias para la variable altura de planta en el ciclo Primavera-Verano 1998. Los valores de la media y la mediana son de 75.93 y 77.60 cm, respectivamente	92
Figura 12	Distribución de frecuencias para la variable excursión en el ciclo Otoño-Invierno 1997. Los valores de la media y la mediana son de 7.97 y 9.32 cm, respectivamente	95
Figura 13	Distribución de frecuencias para la variable longitud de panoja en el ciclo Primavera-Verano 1998. Los valores de la media y la mediana son de 23.70 y 24.10 cm, respectivamente	97
Figura 14	Distribución de frecuencias para la días a floración en el ciclo Otoño-Invierno 1997. Los valores de la media y la mediana son de 60.72 y 61 días, respectivamente	99
Figura 15	Distribución de frecuencias para los días a floración en el ciclo Primavera-Verano 1998. Los valores de la media y la mediana son de 60.68 y 61 días, respectivamente	100

INDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

CUADRO	TITULO	PAGINA
Cuadro 1A	Aleatorización de las familias dentro de los bloques	122
Cuadro 2A	Análisis de varianza de la variable altura de planta O-I 97	123
Cuadro 3A	Análisis de varianza de la variable longitud de panoja O-I 97	123
Cuadro 4A	Análisis de varianza de la variable excersión O-I 97	123
Cuadro 5A	Análisis de varianza de la variable días a floración O-I 97	123
Cuadro 6A	Análisis de varianza de la variable altura de planta P-V 98	123
Cuadro 7A	Análisis de varianza de la variable excersión P-V 98	124
Cuadro 8A	Análisis de varianza de la variable longitud de panoja P-V 98	124
Cuadro 9A	Análisis de varianza de la variable días a floración P-V 98	124
Cuadro 10A	Análisis de varianza de la variable días a madurez fisiológica P-V 98	124
Cuadro 11A	Análisis de varianza de la variable rendimiento por planta P-V 98	124



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

NOMENCLATURA

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AMPPD	3-(2'-Spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3''-phosphoryloxy)-phenil-1,2-dioxetane
AP-PCR	Arbitrary Primed-PCR
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Regions
CIMMYT	Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo
cM	CentiMorgans
CSPD	disodium 3-(4-methoxyspirol {1,2-dioxetane-3,2'(5''chloro)tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}] decan}-4-yl) phenyl phosphate
CTAB	Mezcla de alquiltrimetil-bromuro de amonio
DAF	DNA Amplified Polymorphic
DNA	Deoxyribonucleic acid
dATP	Deoxiadenosina 5'-trifosfatada
dCTP	Deoxicitidina 5'-trifosfatada
dGTP	Deoxiguanosina 5'-trifosfatada
dNTP's	Deoxinuclétidos 5'-trifosfatados
dTTP	Deoxitimosina 5'-trifosfatada
ELOD	LOD esperado
EtBr	Bromuro de Etidio
LB	Luria-Broth (medio de cultivo)
LGMA	Laboratorio de Genética Molecular Aplicada
LOD	Logaritmo de los odds
MAS	Marker Assisted Selection
PCR	Polimerase Chain reaction, Reacción en Cadena de la Polimerasa
QTL	Quantitative Trait Loci
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SCAR	Sequence-Characterised Amplified Regions
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SPAR	Single Primer Amplification Reaction
SSC	Citrato de sodio salino
SSR	Simple Sequences Repeat
STM	Sequence-Tagged Microsatellites
STR	Short Tandem Repeats
STS	Sequence-Tagged Sites
TE	Tris-EDTA (buffer)
TNE	Tris sodio (Na) EDTA (buffer)
UMC	University of Missouri-Columbia

INTRODUCCIÓN

En los últimos años la tecnología del DNA (deoxyribonucleic acid) recombinante ha tenido un enorme impacto sobre la ciencia de las plantas; por ejemplo, se ha utilizado en la identificación y localización de genes en muchas especies. Dentro de esta misma tecnología, existe un interés especial en los marcadores moleculares como herramientas genéticas en el mejoramiento de plantas. Los marcadores moleculares se utilizan para identificar y localizar loci que afectan a caracteres cuantitativos así como para el monitoreo de los mismos, durante programas de introgresión y selección (Soller and Beckmann, 1983).

La construcción de mapas de ligamiento genético y localización de genes dentro de los mismos, tuvo su origen en los estudios realizados por A. H. Sturtevant con *Drosophila* en 1911. El desarrollo de la teoría estadística y los trabajos de Mather sobre la distribución de los genes de caracteres cuantitativos también en *Drosophila* durante los 40s y 50s, así como el desarrollo de los marcadores moleculares a partir de los 60s, incrementaron en forma considerable las investigaciones relacionadas con la construcción de mapas de ligamiento genético e identificación y localización de genes y QTL (quantitative trait loci). En los últimos 15 años, debido al desarrollo de nuevas tecnologías y herramientas, la identificación y localización de genes se ha vuelto más fácil abriendo la oportunidad de realizar clonación de genes y mejoramiento en forma directa.

Los mapas de ligamiento genético han jugado un papel importante en el mejoramiento de plantas, se han utilizado para determinar la evolución y organización del genoma, para identificar regiones del mismo relacionadas con caracteres de

importancia agronómica, para mejorar la eficiencia de los programas de retrocruzas, para introducir uno ó más genes de un progenitor donador dentro de un fondo genético de una variedad élite (programas de selección asistida por marcadores) y recientemente para aislamiento o clonación de genes

En la actualidad existe una gran cantidad de mapas de ligamiento de diversas especies vegetales: Poaceae (arroz, maíz, sorgo, cebada, trigo avena), Solanaceae (tomate, papa, chile) y Brassicaceae (*Arabidopsis*, repollo, mostaza, nabo, colza) (Xu, 1997). El tomate y el maíz son los cultivos más estudiados y por tanto sus mapas de ligamiento son los más completos, en éstos mismos cultivos existe el mayor número de investigaciones encaminadas a localizar QTL de caracteres de interés agronómico.

En las últimas cuatro décadas, el sorgo ha incrementado su importancia económica en México, es un cultivo con alta producción y amplia adaptación a las diferentes condiciones del país. México es el quinto productor de grano de sorgo después de E.U.A., India, China y Nigeria. A nivel nacional, el sorgo ocupa el tercer lugar en extensión de siembra después del maíz y el frijol y el segundo en producción de grano (Narro *et al.*, 1998). Los datos de producción de sorgo obtenidos de plantas

en el campo, indican que el potencial de producción de biomasa del cultivo no se está alcanzando, en gran parte debido a contrastes impuestos por el estrés biótico y abiótico (Casas *et al.*, 1997).

Como resultado de décadas de investigación en mejoramiento genético, se han identificado alrededor de 200 caracteres de herencia mendeliana en sorgo (Ragab *et al.*, 1994). A pesar de lo anterior, el sorgo es un cultivo cuya caracterización genética es aún limitada, los mapas de ligamiento genético desarrollados son pocos. Debido a su estrecha relación con el maíz, los primeros mapas de ligamiento de RFLP (restriction fragment length polymorphism) se construyeron con sondas de este cultivo, posteriormente se desarrollaron sondas del mismo sorgo y recientemente se han

incorporado SSR (simple sequences repeat, microsátélites) con el fin de complementar los espacios vacíos de los mapas de RFLP. Los estudios sobre QTL en éste cultivo, básicamente se han llevado a cabo para comparar las regiones del genoma con las del maíz. La mayoría de los mapas de ligamiento genético, así como los estudios de localización de QTL se han realizado en las poblaciones desarrolladas por Pereira *et al.* (1994) y Xu *et al.* (1994), limitando en mucho la información para estudios en otras poblaciones.

En al Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León se llevan a cabo programas de mejoramiento genético en sorgo utilizando los métodos convencionales; actualmente, existe un marcado interés en localizar regiones del genoma responsables de caracteres relacionados con el rendimiento del cultivo mediante la tecnología del DNA recombinante. Los datos generados podrán incorporarse dentro de los esquemas de mejoramiento utilizados, o bien permitirán la generación de nuevos esquemas para seguir con el mejoramiento genético del sorgo con resultados en lapsos de tiempo cortos. Cuando dentro de una investigación se busca identificar QTL o regiones del genoma relacionadas a caracteres de interés

agronómico, es conveniente evaluar la población en dos ambientes diferentes, es necesario puntualizar que los QTL identificados en una población en un ambiente determinado no son necesariamente los mismos de otro ambiente diferente con la misma población.

Debido a lo anterior, se planteó como objetivo general de ésta investigación, la construcción de un mapa de ligamiento genético de *Sorghum bicolor* para localizar QTL que controlan caracteres de importancia agronómica; para alcanzar con dicho objetivo fue necesario cumplir con los siguientes objetivos específicos:

- 1) Evaluación de la población de familias F₃ (SJ7 X 22830) durante los ciclos agrícolas Otoño-Invierno 97 y Primavera-Verano 98;

- 2) Generación de marcadores tipos RFLP y SSR;
- 3) Optimización de las siguientes técnicas a las condiciones del Laboratorio de Genética de la FAUANL: etiquetado de sondas genéticas con digoxigenina, transferencia de DNA a membranas fijas (Southern blotting), hibridación y lavados para la obtención de RFLP;
- 4) Optimización de la temperatura de alineación de iniciadores en reacciones de PCR (polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa) para la obtención de SSR;
- 5) Identificación y localización de QTL asociados a caracteres de importancia agronómica.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Utilidad de los mapas de ligamiento genético

Los mapas de ligamiento genético son la representación del genoma de un individuo en grupos de ligamiento que corresponden a los cromosomas; en cada grupo de ligamiento se determina el orden y posición de los marcadores moleculares. La construcción de mapas de ligamiento genético por medio de marcadores moleculares permite la identificación de genes y de regiones del genoma que regulan caracteres cuantitativos (QTL). Los genes identificados pueden introducirse en los cultivos mediante esquemas de selección asistida por marcadores (MAS, marker-assisted selection) o bien, aislarse o clonarse para ser introducidos en el genoma de la planta a mejorar.

Un ejemplo de la utilidad de los mapas de ligamiento genético, es que han permitido estudiar la evolución divergente del sorgo y maíz (Whitkus *et al.*, 1992). La colinealidad de los mapas de ligamiento del trigo, arroz, cebada y maíz, construidos con diferentes marcadores moleculares, sugiere la posibilidad de reconstruir el mapa genético del ancestro de los cereales (Xu, 1997).

2.2 Marcadores genéticos

2.2.1 Definición

Un marcador genético es cualquier alelo de interés (Lewin, 1994) cuyo patrón de herencia puede ser seguido en forma morfológica (color de flor), bioquímica (isoenzimas) o a nivel del DNA. Se le llama marcador porque se utiliza para obtener información de forma indirecta, acerca de la herencia de caracteres de interés.

Un carácter, puede considerarse como marcador genético sí: a) está determinado genéticamente, b) puede clasificarse con certeza, c) tiene un patrón de herencia inequívoco y d) presenta variación hereditaria contrastante para permitir su clasificación como un polimorfismo genético (Barrera, 1992). Existen dos clases de marcadores genéticos: morfológicos y moleculares.

2.2.2 Polimorfismo

La facilidad con la que un mapa de ligamiento genético puede desarrollarse y aplicarse a un cultivo específico, depende de la complejidad genética de la especie y de la extensión del polimorfismo presente.

La baja frecuencia de polimorfismo en el DNA de una especie, puede limitar la utilización de marcadores moleculares en cruza que son de importancia agronómica pero que involucran progenitores genéticamente cercanos, por tal motivo, es necesario evaluar el nivel de polimorfismo de DNA presente en una especie antes de realizar investigaciones con marcadores moleculares (Tao *et al.*, 1993).

Los polimorfismos son variaciones en la secuencia de DNA que ocurren en promedio una vez cada 300 a 500 bp, las variaciones dentro de los exones (secuencias codificantes) pueden observarse como cambios en el color de la semilla, altura de

planta y susceptibilidad a las enfermedades. Sin embargo, la mayoría de las variaciones ocurren en los intrones (secuencias que no codifican) y tienen poco o ningún efecto en la apariencia del organismo, éstas variaciones son detectables a nivel del DNA y pueden utilizarse como marcadores moleculares (CIMMYT, 1996).

2.2.3 Marcadores morfológicos

Los marcadores morfológicos están basados en caracteres "morfológicos" controlados por un locus simple, que se utiliza como marcador genético si su expresión se mantiene constante en ambientes diferentes (Staub *et al.*, 1996).

2.2.4 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares incluyen a las isoenzimas, RFLP y marcadores derivados de la PCR como RAPD (random amplified polymorphic DNA), SPAR (single primer amplification reaction), DAF (DNA amplified polymorphic), AFLP (amplified fragment length polymorphism), SSR y otros. A los RFLP y marcadores derivados de la

PCR se les llaman también marcadores moleculares basados en el DNA. Los primeros marcadores moleculares utilizados fueron las isoenzimas, que se desarrollaron durante la década de los 70s. Durante los 80s se desarrollaron los RFLP y, con el descubrimiento de la PCR por Mullis en 1987, surgieron los RAPD durante la década de los 90s.

El concepto de marcador molecular se basa en el hecho de que el locus marcador, identifica o marca el segmento del cromosoma en su proximidad y permite que éste sea seguido a través de varias manipulaciones genéticas. Los marcadores moleculares pueden estar localizados en regiones del DNA que codifican para un carácter (genes) o en regiones cuya función codificante no se conoce (Stuber, 1989).

La utilización de los marcadores moleculares en diferentes áreas del mejoramiento genético en plantas abarca: estudios de diversidad genética, identificación de variedades, líneas puras e híbridos; estimación de distancias genéticas entre poblaciones, variedades, líneas puras e híbridos; determinación de las relaciones de parentesco o pedigree; construcción de mapas de ligamiento genético, localización e identificación de genes y QTL en programas de selección asistida por marcadores.

Los marcadores moleculares deben ser polimórficos para que puedan utilizarse en la construcción de mapas de ligamiento genético; esto es, que existan formas alternativas entre individuos que sean detectadas en la progenie de un cruzamiento. Los marcadores moleculares basados en el DNA pueden obtenerse del DNA extraído en cualquier etapa del ciclo de vida del organismo y de cualquier tejido, incluso de herbarios y tejidos momificados (Beckmann and Soller, 1986).

Las características ideales de un marcador molecular para utilizarse en mejoramiento de plantas son (Moreno, 2001):

1. Polimorfismo.
2. Herencia mendeliana y no epistasis.
3. No influencia de los efectos ambientales.
4. No interferencia en el desarrollo de la planta (comportamiento como gen neutro).
5. Facilidad de expresión, identificación y análisis.
6. Codominancia.
7. Detección en etapas tempranas del desarrollo de las plantas.

2.2.4.1 Isoenzimas

La utilización de isoenzimas como marcadores moleculares se basa en el hecho de que cada enzima cataliza reacciones bioquímicas específicas, que se pueden visualizar en un gel (Staub *et al.*, 1996). Los primeros mapas de ligamiento genético en maíz, tomate, trigo y pino se construyeron con isoenzimas como marcadores moleculares. Asimismo, éstos marcadores fueron los primeros en identificar QTL en maíz, tomate (*Lycopersicon spp.*), avena silvestre (*Avena fatua L.*) y soya (*Glycine max*) (Dudley, 1993).

2.2.4.2 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción o RFLP, fueron desarrollados por Botstein *et al.* (1980) para la construcción de mapas de ligamiento genético en humanos. Se producen cuando la molécula de DNA es digerida con enzimas de restricción que la cortan en sitios con secuencias específicas. Los polimorfismos o alelos tienen su origen en cambios en la secuencia de las bases del sitio de reconocimiento, o en rearrreglos del DNA que afectan el tamaño de los fragmentos producidos y ocurren en forma natural (Kochert, 1994).

Una vez que se ha digerido el DNA con enzimas de restricción, los fragmentos del mismo se separan por electroforesis y se fijan a una membrana de nylon o nitrocelulosa por medio de Southern blotting. El DNA así inmovilizado, se somete a hibridación con sondas marcadas o etiquetadas para permitir su detección por medio de placas de rayos X (autoradiografías). En la Figura 1 se muestra en forma esquemática el procedimiento para la generación de RFLP.

Los RFLP tienen herencia mendeliana, muestran codominancia por lo que los heterocigotes pueden distinguirse de los homocigotes, son altamente reproducibles y pueden utilizarse prácticamente en todas las especies y/o niveles de la población. Las

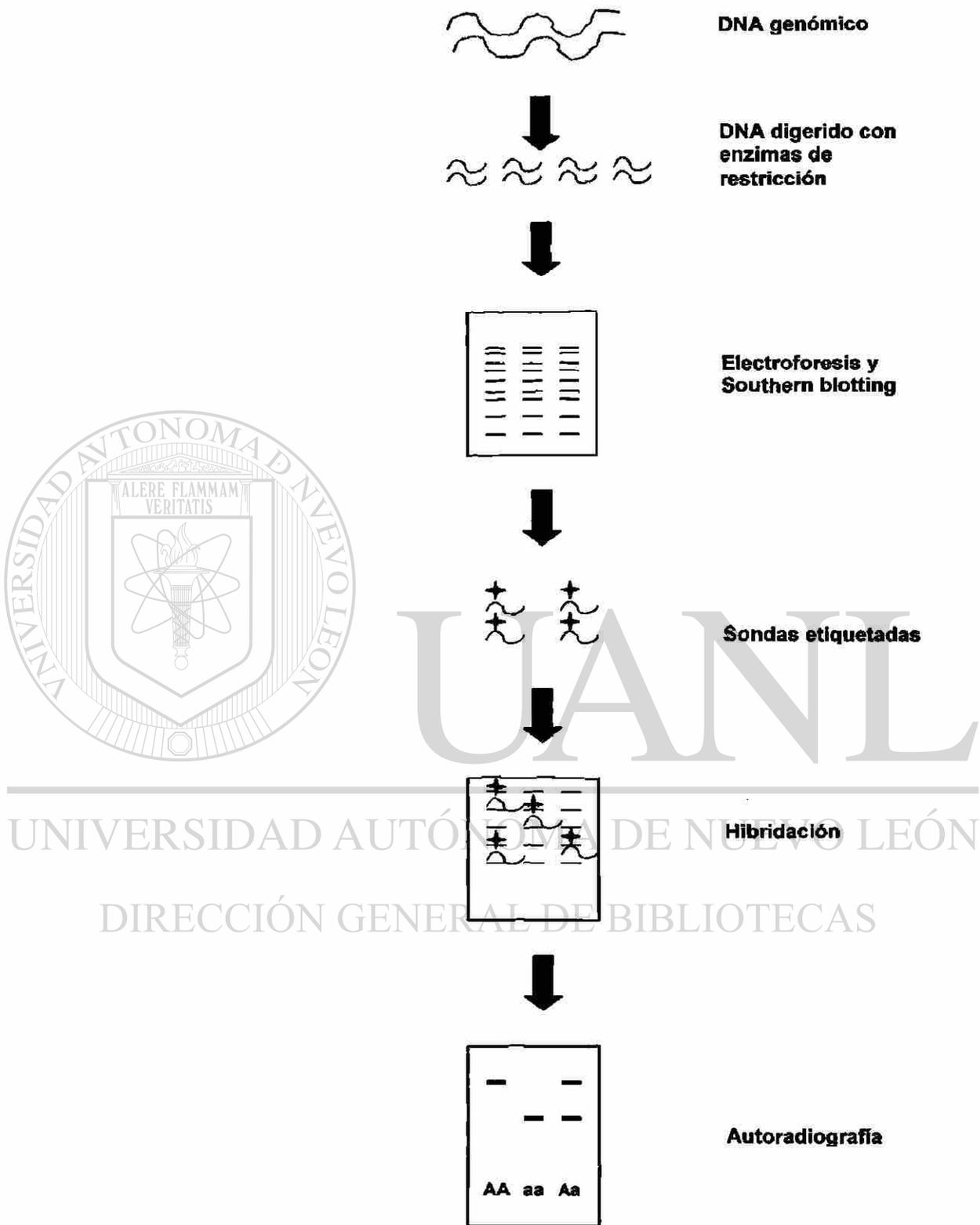


Figura 1. Representación esquemática de la generación de RFLP.

desventajas de los RFLP son que requieren mayores cantidades de DNA y pureza que los marcadores basados en PCR (se necesitan mínimo 7.5 µg de DNA por muestra para realizar una hibricación), son caros y demandan habilidad técnica y tiempo para su generación.

Los RFLP fueron los primeros marcadores basados en DNA que se utilizaron en genética y mejoramiento de plantas. La evolución de la organización de los cromosomas, caracterización taxonómica y medición de la variabilidad genética son algunas de las áreas de estudio que han sido enriquecidas con el uso de RFLP (Yang *et al.*, 1996). Dentro de los programas de mejoramiento clásico, los RFLP proveen un medio para la manipulación de QTL como entidades mendelianas, que pueden manejarse más fácilmente y son sensibles para propósitos de ingeniería genética (Beckmann and Soller, 1986 y Lander and Botstein, 1989).

Los RFLP detectan principalmente polimorfismos en regiones alrededor de la sonda, mientras que los marcadores basados en PCR detectan la variación solamente dentro de la región amplificada. Los análisis de Southern de los RFLP, detectan el polimorfismo en un área mayor mientras que los de PCR detectan variaciones más pequeñas (IPGRI, 1996).

Las isoenzimas y RFLP se prefieren sobre los marcadores morfológicos debido a que (Staub *et al.*, 1996):

1. Los alelos de la mayoría de los marcadores moleculares son codominantes, por lo que se distinguen en poblaciones segregantes; mientras que con marcadores morfológicos, las interacciones dominante-recesiva no permiten distinguir entre genotipos homocigóticos dominantes y los heterocigóticos.
2. Los genotipos en los marcadores moleculares pueden determinarse en todas las plantas, tejidos o niveles celulares mientras que en los

morfológicos pueden observarse sólo el estadio de la planta en que el carácter se expresa, generalmente cuando esta madura.

3. En la mayoría de las especies de plantas existe en forma natural un número grande de alelos en el caso de marcadores moleculares, no siendo así en caracteres morfológicos, donde generalmente los alelos se deben inducir por mutagénesis.
4. En marcadores moleculares, los alelos raramente muestran efectos perjudiciales, mientras que con los marcadores morfológicos ocurre lo contrario.
5. Las interacciones desfavorables ocurren de manera frecuente entre loci que codifican caracteres morfológicos, limitando el número de marcadores segregantes que pueden ser utilizados en una población específica.

2.2.4.2.1 Sondas. Las sondas son ácidos nucleicos utilizados para identificar ácidos nucleicos complementarios mediante su hibridación (formación de una molécula doble de ácidos nucleicos, a partir de moléculas de cadena sencilla que tiene secuencias de cadena complementaria de bases nitrogenadas). Cada sonda puede definir un locus, su segregación puede seguirse a través de la descendencia, haciendo posible el análisis y localización de genes responsables de un carácter (Botstein *et al.*, 1980)

En el sistema tradicional de marcadores RFLP, estas secuencias únicas de DNA pueden obtenerse de dos fuentes: DNA nuclear y DNA citoplasmático. Las sondas de DNA nuclear se obtienen de clones de cDNA (mRNAs transcritos en reversa). Estas sondas se seleccionan de genotecas de clones únicos (sin secuencias repetidas). En cambio, las sondas de DNA citoplasmático, provienen de genotecas de DNA de mitocondrias y cloroplastos (IPGRI, 1996).

Las sondas de cDNA limitan el análisis a regiones codificantes del genoma, o secuencias flanqueadoras, mientras que las sondas genómicas se extienden a mayor porción del genoma, exceptuando a las regiones repetitivas (Beckmann and Soller, 1986). Los mapas basados en sondas cDNA, dan la oportunidad de localizar genes anónimos y regiones responsables de caracteres cuantitativos (QTL) que se expresan y controlan funciones biológicas. Debido a la homología en la secuencia de nucleótidos de las especies relacionadas, los genes que son clonados en una especie, pueden utilizarse como sondas en una hibridación heteróloga con el propósito de localizar genes equivalentes en especies relacionadas genéticamente.

La utilidad en la construcción de mapas de ligamiento genético en especies relacionadas con una fuente común de sondas RFLP, ha sido demostrada en algunas solanáceas como tomate, chile y papa, en donde la secuencia de nucleótidos de la mayoría de los genes se conservan lo suficiente para permitir la hibridación heteróloga (Hulbert *et al.*, 1990).

2.2.4.2.2 Sondas UMC (University Missouri-Columbia). El sorgo y el maíz tienen el mismo número de cromosomas ($n = 10$) aunque su contenido del DNA nuclear es diferente (el contenido del DNA de sorgo determinado por microdensometría es una tercera parte que el de maíz) (Binelle *et al.*, 1992). Hulbert *et al.* (1990) fueron los primeros en probar la utilidad de las sondas de maíz para detectar RFLP en sorgo, las hibridaciones con sondas cDNA de maíz producen una señal de mayor calidad al corresponder a regiones codificantes de genes que se conservan entre estas especies (Pereira *et al.*, 1994). Las sondas de maíz hacen posible la construcción de mapas de ligamiento genéticos de sorgo que se puede comparar con el mapa de ligamiento genético del maíz.

Las sondas de maíz UMC fueron desarrolladas a partir de una población inmortalizada F₂ de la cruce Tx303 X CO159 y seleccionadas bajo los criterios de que: fueran sondas de bajo número de copias, que produjeran polimorfismos de fácil interpretación a través de una variedad de líneas endogámicas, y que los loci marcadores que revelaran no tuvieran un espaciado mayor de 30 cM (22% de recombinación) (Gardiner *et al.*, 1993).

Las sondas UMC han sido utilizadas por varios investigadores para la construcción de mapas de sorgo; se encontró que las sondas hibridan en forma eficiente y detectan suficientes polimorfismos para generar mapas de ligamiento genético de RFLP (Bennetzen and Melake-Berham, 1994; Peng *et al.*, 1999, Pereira *et al.*, 1994, Pereira and Lee, 1995 y Xu *et al.*, 1994). Con aproximadamente la tercera parte de las sondas de maíz se puede cubrir la mayoría del genoma de sorgo. Dado que la posición genómica de estos loci en el genoma del sorgo puede predecirse por su posición en el genoma del maíz, es posible seleccionar clones para áreas específicas del genoma (Hulbert *et al.*, 1990).

Ragab *et al.* (1994) aseguraron que el uso exclusivo de sondas heterólogas de maíz en sorgo puede dejar ciertas áreas del genoma sin cubrir. Con el fin de cubrir todos estos posibles espacios, varios investigadores han creado sondas cDNA de sorgo encontrando que estas hibridan en nivel más alto y uniforme que las sondas cDNA de maíz (Seetharama *et al.*, 1993 y Xu *et al.*, 1994).

2.2.4.2.3 Etiquetado de sondas. Existen dos tipos de etiquetado de sondas: el etiquetado radioactivo, el cual se utiliza en forma frecuente y, el etiquetado no radioactivo que se utiliza menos frecuentemente pero que elimina los riesgos y complicaciones de trabajar con radioactividad.

Las sondas etiquetadas por sistemas no radioactivos son estables por períodos de tiempo más largos que las etiquetadas con ^{32}P (radioactividad), por lo que pueden utilizarse para varios experimentos (Kochert, 1994) y requieren de tiempos de exposición (con el film de rayos X) menores para ser detectadas (Karcher, 1995).

Debido a que para la construcción del mapa reportado en este trabajo se utilizó el método de etiquetado no radioactivo (sistema digoxigenina-antidigoxigenina) se hace una breve descripción del mismo.

El etiquetado no radioactivo incluye los sistemas de peroxidasa, digoxigenina-antidigoxigenina y biotina-estreptomidina (Brown, 1990 y Kochert, 1994). Las sondas etiquetadas por estos sistemas pueden detectarse por colorimetría o quimioluminiscencia, dependiendo de las enzimas involucradas en cada sistema (Kochert, 1994).

El sistema digoxigenina-antidigoxigenina utiliza al esteroide cardenolido "digoxigenina" aislado de *Digitalis*, el cual está contenido en un nucleótido trifosfatado y se incorpora dentro de la sonda por "nick traslation", "random priming" o PCR. Una vez etiquetada la sonda se detecta por inmunoensayo utilizando el anticuerpo "antidigoxigenina" a la que se le ha conjugado fosfatasa alcalina (CIMMYT, 1996).

El sustrato quimioluminiscente que se utiliza para detectar la digoxigenina es el dioxetano, el cual emite luz cuando se activa por medio de enzimas debido a que contiene un grupo fosfato que se activa por la fosfatasa alcalina fijada a la sonda. Los compuestos quimioluminiscentes incluyen al AMPPD (3-(2'-Spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3''-phosphoryloxy)-phenil-1,2-dioxetane) y al CSPD (disodium 3-(4-methoxyspirol {1,2-dioxetane-3,2'(5-''chloro) trycilo [3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-yl) phenyl phosphate); la detección se realiza por medio de una película de rayos X. Dado que la señal es fuerte se requiere de tiempo de exposición menor de 24 horas (Karcher, 1995).

Las sondas etiquetadas con digoxigenina pueden almacenarse hasta que se vayan a utilizar (permanecen viables hasta cinco años). Es importante recordar que la reacción de quimioluminiscencia debe ser a una temperatura de 37°C para que se aumente la actividad de la enzima, aunque normalmente se realiza a temperatura ambiente.

2.2.4.3 Marcadores basados en la PCR

Los sistemas de marcadores desarrollados a partir de la PCR siguen alguna de las tres siguientes estrategias (Staub *et al.*, 1996):

1. Marcadores amplificados con un iniciador simple. La diversidad de los marcadores resulta de la variación en la longitud y/o secuencia de los iniciadores; los nucleótidos anclas están presentes en el extremo 5' ó 3' de los iniciadores, por ejemplo RAPD, SPAR, DAF, AP-PCR (arbitrary primed-PCR).

2. Marcadores que son amplificados en forma selectiva con dos iniciadores. Su selectividad proviene de la presencia de dos a cuatro bases al azar en los extremos 3' de los iniciadores que se alinean al DNA objetivo durante la PCR, por ejemplo AFLP.

3. Marcadores amplificados utilizando dos iniciadores los cuales requieren comúnmente información de secuencia para la construcción de los iniciadores específicos, por ejemplo AMP-FLP (amplified fragment length polymorphism), STR (short tandem repeats) y SSR.

La ventaja de la PCR en la generación de marcadores es que requiere solamente de pocos nanogramos (ng) del DNA molde (objetivo). Su eficiencia y rapidez ha permitido que se utilice como una alternativa a las técnicas que utilizan análisis de Southern. Su limitante en cambio, es que en algunos análisis se requiere de información de secuencia para sintetizar los iniciadores (CIMMYT, 1996).

2.2.4.3.1 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Los fragmentos de polimorfismo de secuencia amplificada ó AFLP fueron desarrollados en 1992 por Marc Zabeau y colaboradores de Keygene N.V. Fueron desarrollados como un método altamente sensible para obtener las huellas genéticas del DNA (fingerprints) en diversas áreas como el mejoramiento animal y vegetal, diagnóstico médico, análisis forense e identificación de microbios (Melcher, 1997). Recientemente, los AFLP se han utilizado para la clonación de genes involucrados en la respuesta fototrópica de las plantas superiores, así como para la identificación de marcadores flanqueadores del gen de resistencia Cf-9 en tomate (Liscum and Oeller, <http://afip.html.enplantbiology.stanford.edu>).

La técnica de AFLP involucra tres pasos: 1) digestión del DNA y ligamiento de oligonucleótidos adaptadores, 2) amplificación preselectiva y selectiva de juegos de fragmentos de restricción y 3) análisis de los fragmentos amplificados en el gel (Vos *et al.*, 1995). En la Figura 2 se observa la representación esquemática para la generación de los AFLP. La amplificación por PCR de los fragmentos de restricción se realiza utilizando como sitios objetivos de alineación de los iniciadores, a los adaptadores y sitios de secuencia de restricción. El procedimiento es el siguiente: el DNA genómico es digerido con enzimas de restricción (generalmente dos), los oligonucleótidos adaptadores de secuencia definida se unen (ligan) en los extremos de los fragmentos de restricción (una sola reacción) (Vos *et al.*, 1995).

La amplificación preselectiva se lleva a cabo al utilizar iniciadores arbitrarios que se extienden dentro de los fragmentos de restricción, amplificando solamente a los fragmentos en los que los iniciadores se unen a los nucleótidos que flanquean los sitios de restricción. La amplificación selectiva de los fragmentos amplificados en el paso anterior, se realiza con iniciadores específicos (los iniciadores tienen tres nucleótidos

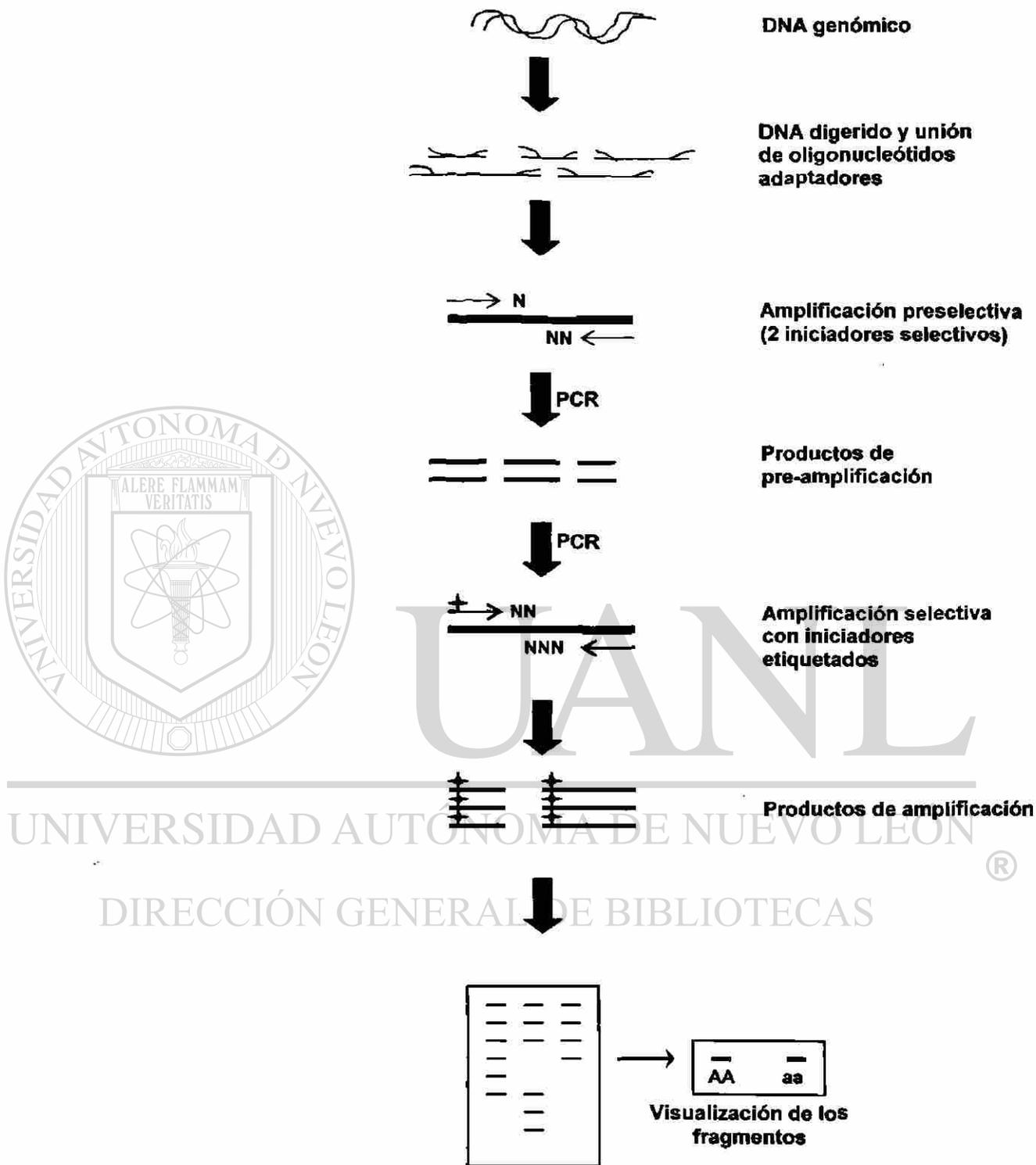


Figura 2. Representación esquemática de la generación de AFLP (modificado de Staub *et al.*, 1996).

selectivos, el primero es el mismo del iniciador utilizado en la amplificación preselectiva, los otros son cualquiera de las 16 posibles combinaciones de los cuatro nucleótidos) etiquetados con radioactividad, fluorescencia o quimioluminiscencia. Los fragmentos etiquetados amplificados se visualizan en geles de poliacrilamida (Vos *et al.*, 1995 y Perkin-Elmer Lab).

Debido a que es una técnica combinada de RFLP y PCR, presenta alta sensibilidad para detectar polimorfismos (IPGRI, 1996), aunque el número de polimorfismos que pueden ser analizados depende de la resolución del sistema de detección (tipo de etiquetado de los iniciadores). En genomas complejos, el número de polimorfismos detectados por los AFLP es ilimitado, la combinación de enzimas de restricción de seis y cuatro bases permite la amplificación de 100 000 fragmentos únicos de los cuales, 50-100 son seleccionados para cada reacción (Vos *et al.*, 1995).

Las ventajas de los AFLP son su alta sensibilidad ya que cada fragmento corresponde a una posición única en el genoma y puede ser caracterizado por su tamaño e iniciador requerido, su alta reproducibilidad, y campo de amplia aplicación (IPGRI, 1996). Entre las desventajas de este sistema de marcadores se encuentran el

alto costo para su generación, demanda de habilidad técnica, problemas de interpretación y sensibilidad a las condiciones de reacción de PCR (calidad de DNA y temperaturas de alineación) Vos *et al.*, 1995 e IPGRI, 1996).

Estos marcadores se expresan como dominantes tal y como los RAPD, pero debido a que la variación de la secuencia que ellos detectan es similar a la detectada por los RFLP, se generan resultados similares a éstos cuando se utilizan en ensayos de diversidad genética (CIMMYT, 1996). Cuando el polimorfismo es debido a secuencias dentro de la región amplificada, los AFLP pueden considerarse marcadores codominantes. Los AFLP permiten distinguir heterocigotes cuando se utiliza un scanner para el análisis de los geles (IPGRI, 1996).

De acuerdo a Staub *et al.* (1996), los AFLP son cuantitativos debido a que tanto los individuos homocigóticos como heterocigóticos pueden diferenciarse por la intensidad de las bandas. Si el polimorfismo de los AFLP es debido a la presencia o ausencia de un sitio de reconocimiento del iniciador, la relación es de dominancia, por lo que el alelo que no contiene el sitio no será detectado como una banda (IPGRI, 1996). Debido a sus características, los AFLP puede utilizarse para la construcción de mapas de ligamiento genético de alta densidad, en la mayoría de la especies es el método más eficiente para éste fin si se compara con las otra técnicas de marcadores moleculares (Vos *et al.*, 1995).

2.2.4.3.2 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Los polimorfismos de DNA amplificado al azar ó RAPD se generan cuando se amplifica DNA con un iniciador de secuencia arbitraria (usualmente de 10 nucleótidos de longitud), que detecta polimorfismos en ausencia de una secuencia específica de nucleótidos; éstos polimorfismos funcionan como marcadores genéticos y fueron desarrollados por Williams *et al.*, (1990).

El iniciador se une al DNA en dos sitios diferentes en las cadenas opuestas del molde de DNA, si estos sitios están dentro de una distancia amplificable uno de otro, se produce un producto a través de la PCR. Cada producto de la amplificación, identifica de manera completa o parcial, la secuencia complementaria de nucleótidos entre el DNA genómico y el iniciador ubicado en cada extremo del producto amplificado (Figura 3).

Los RAPD son el resultado de un cambio en una o varias bases nucleotídicas que alteran el sitio de unión del iniciador, o bien de una inserción o deleción dentro de la región amplificada. Estos polimorfismos se manifiestan por la presencia o ausencia de un producto de amplificación por lo que son dominantes; por lo tanto no se

distinguen individuos con dos copias de aquellos que contienen solamente una copia del alelo (CIMMYT, 1996 y Williams *et al.*, 1990). Una característica adicional de estos marcadores es la simplicidad de la técnica debido a que no involucra Southern, hibridación, ni autoradiografías (Williams *et al.*, 1990).

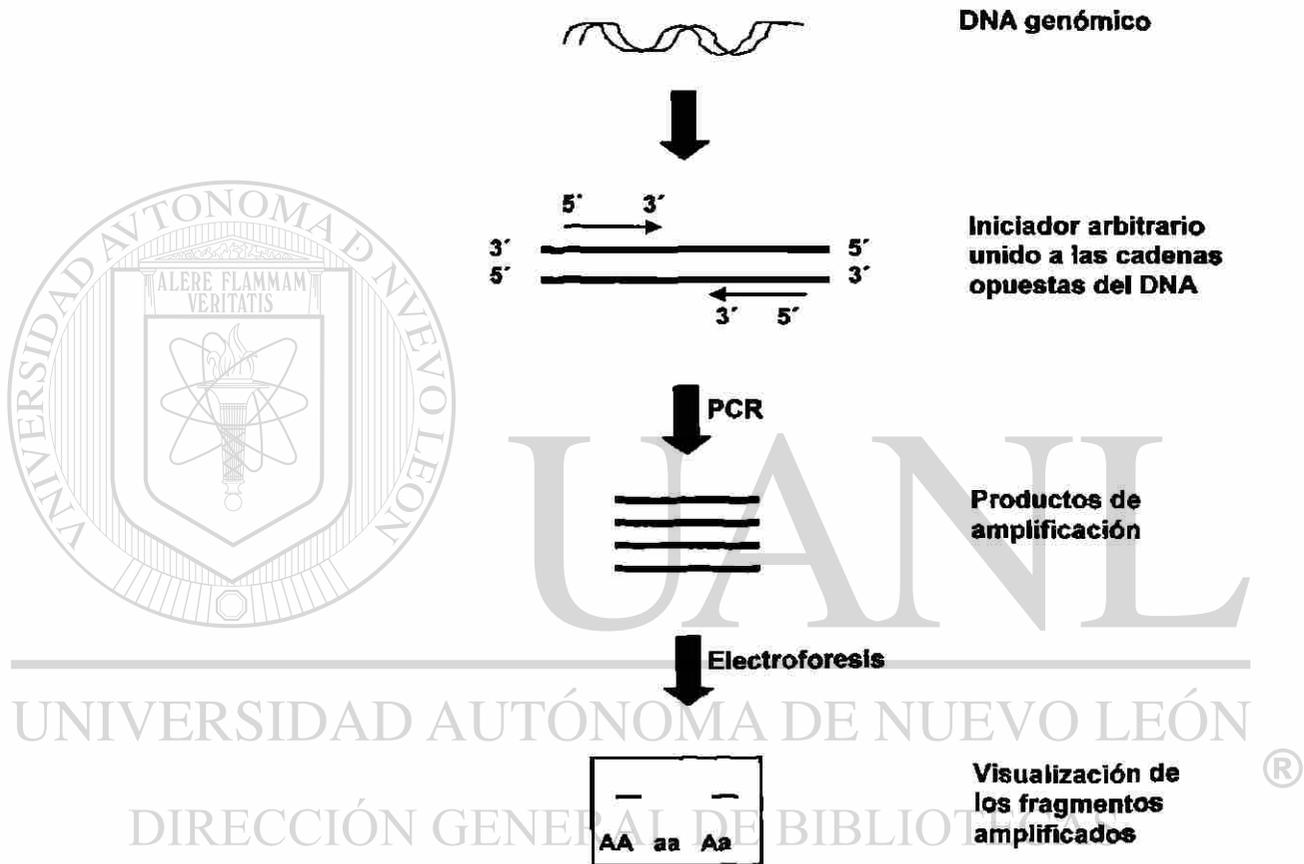


Figura 3. Representación esquemática de la generación de RAPD.

Una de las desventajas de los RAPD es que debido a su dominancia, no pueden distinguirse los individuos homocigotes de los heterocigotes; otra desventaja es que presentan problemas con su reproducibilidad debido a que son sensibles a las

alteraciones en las condiciones de la PCR y por último, presentan problemas de interpretación del patrón de bandas (por ejemplo emigración, en donde la ausencia o presencia de una banda de peso molecular idéntico en diferentes individuos, no es evidencia *per se* de que los individuos compartan el mismo fragmento de DNA). En algunos casos, bandas de diferentes longitudes pueden asignarse al mismo locus, en este caso, los RAPD son marcadores codominantes, cada marcador es el equivalente a un sitio de secuencia etiquetado (Melcher, 1997).

2.2.4.3.3 STS (Sequence-Tagged Sites). Los sitios de secuencia etiquetada propuestos en 1989 por Olson y colaboradores ó STS, son fragmentos cortos únicos de DNA (aproximadamente 300 bp) obtenidos por la PCR, utilizando iniciadores diseñados para amplificar una secuencia conocida que define una región específica de un genoma (Liu, 1998). Los iniciadores utilizados (20 bp) son más largos que los utilizados para RAPD (10 bp) por lo que son menos afectados por las condiciones de reacción (Staub *et al.*, 1996). Los STS generalmente se diseñan para localizar secuencias con bajo número de copias, mientras que los RAPD identifican a menudo secuencias repetitivas de DNA.

Los microsatélites de secuencia etiquetada (STM, sequence-tagged microsatellites), regiones amplificadas de secuencia caracterizada (SCAR, sequence-characterised amplified regions) y secuencias polimórficas amplificadas (CAP, cleaved amplified polymorphic sequence), son modificaciones de los STS. La ventaja de este tipo de marcadores moleculares es que son codominantes, por lo que permiten distinguir entre homocigotes dominantes, recesivos y heterocigotes. La desventaja de estos marcadores es que los iniciadores necesitan información de secuencia antes de diseñarlos (IPGRI, 1996). En la Figura 4 se encuentra la representación esquemática para la generación de STS.

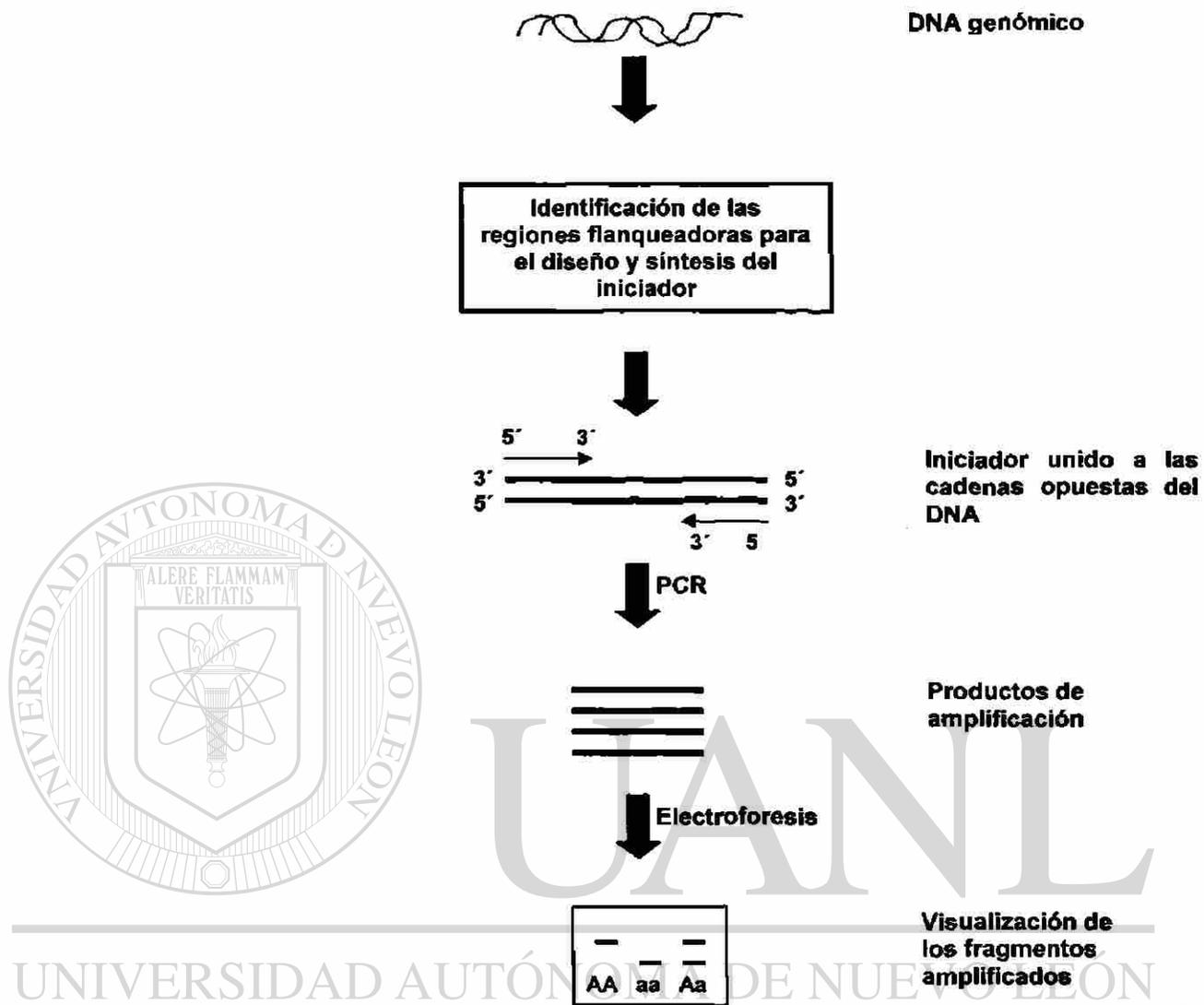


Figura 4. Representación esquemática de la generación de STS.

2.2.4.3.4 Microsatélites ó SSR (Simple Sequence Repeats). Microsatélites es el término dado a las secuencias de nucleótidos repetidas en tandem. Los microsatélites son marcadores codominantes altamente polimórficos. La secuencia básica es generalmente de 1 a 6 bp (el número de repeticiones por microsatélite es usualmente menos de 100) (Liu, 1998). Las secuencias tandem generalmente son de

di-nucleótidos tales como (CA):(GT), (GA):(CT), (CG):(GC) y (AT):(TA) y se encuentran en forma abundante en eucariotes (Staub *et al.*, 1996 y Warner *et al.*, 1992). La secuencia (AT):(TA) prevalece en plantas superiores (Burr, 1994). Las repeticiones de tri o tetra-dinucleótidos tienen frecuencias más bajas que las de di-nucleótidos (Liu, 1998). Las secuencias flanqueadoras de microsatélites están conservadas generalmente dentro de los individuos de la misma especie, permitiendo la selección de iniciadores que amplifican SSR en una gran variedad de genotipos (CIMMYT, 1996).

Con las secuencias flanqueadoras se diseñan los iniciadores, permitiendo de esta manera amplificar los polimorfismos (Figura 5). Un problema en la generación de SSR es que durante el proceso de amplificación, la polimerasa puede cometer errores sobre una o varias de las secuencias básicas, generando así bandas inexistentes. La banda correcta se distingue en el patrón de bandas como mas oscura y el patrón de bandas falsas es típicamente específico de un locus, de tal forma que las bandas de todos los individuos se observan similares. Estas regiones son altamente variables y consecuentemente la mayoría de los individuos son heterocigotes. Los individuos que tienen solamente una banda en una posición son homocigotes (ignorando las bandas artefacto) (Hoelzel and Bancrof, 1992).

La desventaja de los microsatélites es el costo del diseño y síntesis de los iniciadores; sin embargo, a la larga este se paga al reducir el trabajo y costo del material si se compara con los RFLP. A pesar del alto grado de polimorfismo, los alelos de los microsatélites son estables, se estima que su rango de mutación es de 4.4×10^{-5} en ratón (Burr, 1994 y Staub *et al.*, 1996). Investigaciones realizadas con microsatélites han demostrado que el alto nivel de polimorfismo intrínseco en este sistema marcador, puede mejorar el análisis genético de especies vegetales con baja o media variabilidad genética (Taramino *et al.*, 1997).

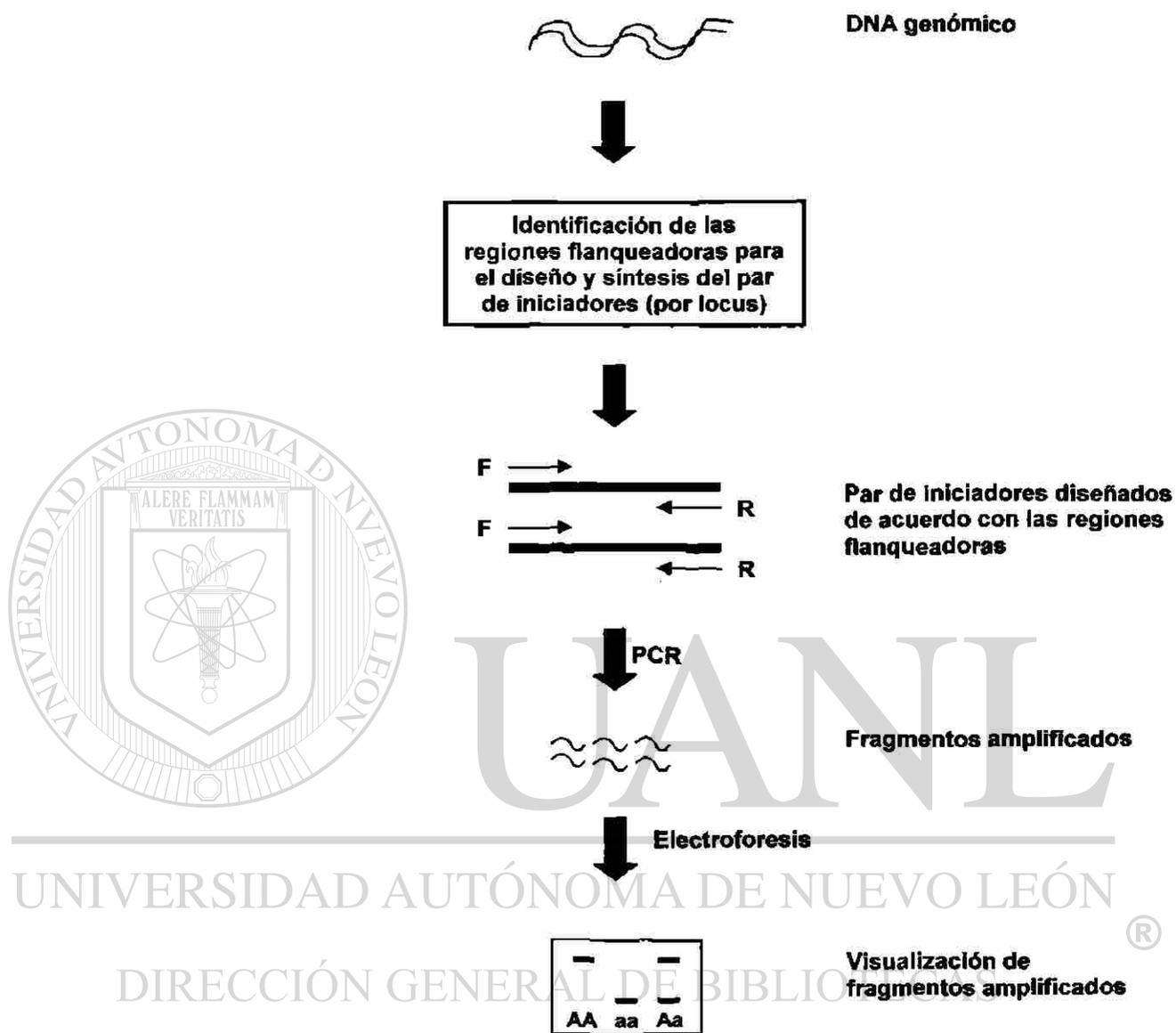


Figura 5. Representación esquemática de la generación de SSR.

2.2.5 Selección de marcadores moleculares

La selección del sistema de marcadores a utilizar en un determinado proyecto, depende de: 1) la estructura de la población, 2) la diversidad genómica de la especie en estudio, 3) el sistema de marcadores disponibles, 4) el tiempo requerido para el análisis y 5) del costo por unidad de información. Cada sistema marcador tiene ventajas y desventajas, por lo que es necesario evaluarlos en detalle antes de usarlos.

El rango de polimorfismo molecular de las especies juega un papel muy importante; por ejemplo, en especies de polinización cruzada, los RAPD son más utilizados para detectar polimorfismos dentro de una pila de genes que los RFLP. El sistema de marcadores utilizado en una especie no necesariamente es eficiente en otra especie (Staub *et al.*, 1996). Los marcadores difieren también en su utilidad entre poblaciones, especies y géneros, los RFLP de una población pueden utilizarse en otras poblaciones de la misma, e incluso de diferente especie; en cambio, en SSR, los iniciadores polimórficos utilizados en una especie no son útiles generalmente en otras.

Los mapas de ligamiento genético basados en RAPD y AFLP se construyen en un periodo corto de tiempo; sin embargo, éstos marcadores no pueden utilizarse en diferentes poblaciones, porque cada marcador está definido por su longitud; es decir, el mismo tamaño de la banda amplificada en diferentes poblaciones y/o especies no significa necesariamente que posean la misma secuencia y menos que provean la misma información (Staub *et al.*, 1996).

Marcadores codominantes (RFLP por ejemplo) son útiles en estudios sobre evolución y en programas de selección asistida por marcadores (MAS) (Staub *et al.*, 1996); sin embargo, el alto costo del desarrollo de los RFLP debido, sobretudo a la cantidad de DNA requerido y al lento proceso en su generación (Cuadro 1), provocan que en la actualidad se tome la decisión de utilizar marcadores basados en PCR.

Cuadro 1. Características principales de los diferentes tipo de marcadores moleculares

Marcador	Poli.	Especificidad de locus	Dominancia ó codominancia	Repro.	DNA	Demanda técnica	Auto.
Isoenzimas	Bajo	Sí	Dominancia	Alta	-	Baja	No
RFLP	Medio	Sí	Codominancia	Media	Alto	Alta	No
AFLP	Medio	No	Dominancia	Alta	Medio	Media	Sí
RAPD	Medio	No	Dominancia	Baja	Bajo	Baja	Sí
STS	Medio	Sí	Codominancia	Alta	Bajo	Baja	Sí
SSR	Alto	Sí	Codominancia	Alta	Bajo	Baja	Sí

Poli = polimorfismo detectado, Repro = reproducibilidad, Auto. = automatización

Los marcadores dominantes proporcionan tanta información como los codominantes en el caso de: líneas endogámicas recombinantes o más avanzadas, líneas haploides duplicadas o poblaciones de retrocruza en fase de acoplamiento (Burr *et al.*, 1988); ésto es debido a que todos los loci son casi o completamente homocigotos (Staub *et al.*, 1996).

En el Cuadro 1 se resumen las principales características de los marcadores moleculares ya descritos, algunas se explican más adelante debido a que son aspectos que deben tomarse en cuenta al momento de seleccionar a los marcadores moleculares. Sí el locus detectado con el marcador molecular es y/o puede identificarse, entonces se presenta especificidad; la demanda técnica se refiere a la habilidad requerida y necesidad de capacitación de las personas responsables de la generación de los marcadores moleculares.

La reproducibilidad de los sistemas de marcadores moleculares depende de las condiciones del laboratorio (equipo e improvisación del mismo cuando no se cuenta con éste), en el caso de los marcadores basados en PCR depende de las condiciones de reacción: marca de los reactivos de la mezcla de PCR y programa térmico (con cada marca de termociclador debe de optimizarse) entre otros. El DNA requerido en los distintos tipos de marcadores moleculares varía de ng (nanogramos) a µg (microgramos), los marcadores que requieren ng de DNA se señalan como "bajo" mientras que los marcadores que requieren de µg de DNA se señalan como "alto".

Entre los aspectos que deben de considerarse al momento de seleccionar el sistema de marcadores a utilizar se incluye:

1. Información que se requiere: es importante escoger los marcadores de acuerdo a la información existente, por principio se debe tener la historia de la población o relaciones filogenéticas y en caso de que lo amerite, datos de secuencias o de los sitios de restricción (para diseño de iniciadores).
2. Cuantos loci se requieren: por ejemplo los SSR proporcionan un número alto de loci (polimorfismos en el Cuadro 1).
3. El nivel de reproducibilidad: ¿son reproducibles los métodos requeridos?
4. Los costos con base a la información proporcionada: los RAPD tienen un costo razonable, mientras que los AFLP y RFLP son más caros pero generan mayor información. En el caso de marcadores que requieren de iniciadores, si las secuencias de los iniciadores no están disponibles pueden generarse costos considerables por ello.
5. Velocidad: en general los métodos basados en PCR dan resultados más rápidos, los métodos que utilizan hibridación son más lentos.
6. Habilidad requerida: los métodos que involucran hibridación, autoradiografías o secuenciación requieren de mayor habilidad mientras que los RAPD son menos demandantes de habilidad y su costo por ensayo es bajo.
7. Disponibilidad de DNA: la mayoría de los métodos basados en PCR requieren de nanogramos de DNA, mientras que los RFLP requieren de microgramos.
8. Modo de herencia: antes de hacer la selección de marcadores se recomienda analizar si son necesarios marcadores codominantes (RFLP, SSR) o es suficiente con marcadores dominantes (RAPD, AFLP).

2.2.6 Número de marcadores moleculares

El número de loci marcadores que segregan en la población y el nivel de desequilibrio de ligamiento en la población, son dos factores que determinan la efectividad del uso de marcadores moleculares para la identificación, localización y manipulación de los factores que afectan los caracteres cuantitativos.

Si se encuentran pocos loci marcadores disponibles para la investigación, se prefiere una población F₂ derivada de la cruce de dos líneas homocigotas debido a que el desequilibrio de ligamiento se maximiza en esta generación (Stuber, 1989). La localización de QTL requiere de marcadores informativos en todas las regiones del genoma, en igual forma la construcción de mapas genéticos de alta resolución; la clonación de genes basada en mapas, requieren de marcadores de DNA espaciados por intervalos cortos (Chittenden *et al.*, 1994).

El número de RFLP necesarios para la construcción de un mapa de ligamiento genético puede ser calculado en términos de la proporción del genoma cubierto como:

$$n = \log (1-P) / \log (1-2c/k)$$

en donde P es la proporción del genoma cubierto, k es la longitud total del genoma en Morgans y c es el espacio en Morgan entre los marcadores. Para propósitos de análisis genético de loci de caracteres cuantitativos y de introgresión, los marcadores deben estar entre 0.2 y 0.4 Morgan (Beckmann and Soller, 1983). Un mapa de alta densidad facilita la selección asistida por marcadores, especialmente entre poblaciones relacionadas estrechamente, ya que incrementa la probabilidad de encontrar un marcador polimórfico informativo en cualquier región del genoma (Chittenden *et al.*, 1994).

2.3 Construcción de mapas de ligamiento genético

La construcción de un mapa de ligamiento genético requiere que el investigador seleccione a la población segregante, calcule las frecuencias de recombinación entre los marcadores moleculares, determine el orden de los mismos y establezca los grupos de ligamiento.

2.3.1 Tipos de poblaciones

La elección de la población segregante para la construcción de mapas de ligamiento genético y localización de QTL, es un punto crítico en la construcción de un mapa genético. En el análisis del ligamiento genético se pueden utilizar varios tipos de poblaciones segregantes. Los atributos deseables de una población para la investigación de caracteres cuantitativos ligados a marcadores moleculares debe incluir: número suficiente (entre mayor número de éstos, mayor es la precisión del mapa) de loci marcadores segregantes disponibles en la población (polimorfismos), distribución uniforme de los loci marcadores en el genoma y distancias reducidas entre ellos (10 cM), así como generaciones con suficiente recombinación, con el fin de que el tamaño de la región del genoma asociada con cada alelo marcador, se haya reducido significativamente (Stuber, 1989).

Algunas de las poblaciones utilizadas en forma frecuente son: F_2 derivadas de híbridos verdaderos F_1 , poblaciones obtenidas por retrocruza, líneas endogámicas recombinantes obtenidas sin selección por el método de semilla individual y poblaciones de líneas haploides duplicadas (Stuber, 1989 y Salinas, 1996).

2.3.1.1 Poblaciones F_2

En la mayoría de las especies de plantas, las poblaciones F_2 y de retrocruza son fáciles de construir o se encuentran ya disponibles; sin embargo, la esterilidad de los híbridos F_1 puede limitar algunas de las combinaciones de los padres, sobretodo cuando se utilizan progenitores taxonómicamente lejanos. Una de las desventajas de estas poblaciones es que son efímeras en la mayoría de las plantas, excepto en las plantas perennes y las propagadas asexualmente (Kochert, 1994; Salinas, 1996 y Young, 1994). Sin embargo, sí los loci marcadores disponibles son pocos, pueden utilizarse poblaciones F_2 derivadas de cruza de líneas homocigotas, debido a que el desequilibrio de ligamento es máximo en esta generación. De acuerdo con Hanson (1959) citado por Stuber (1989), con el uso de F_2 , grandes regiones del genoma son representadas por un loci marcador específico.

El uso de poblaciones F_2 proporciona más información de mapeo cuando se analizan marcadores codominantes (Staub *et al.*, 1996); así, los cromosomas recombinados pueden ser identificados en cada individuo.

2.3.1.2 Poblaciones de retrocruza

Las poblaciones obtenidas por retrocruza pueden utilizarse para producir mapas de un sexo específico dependiendo del sexo del progenitor recurrente. Los mapas obtenidos para machos y hembras varían frecuentemente en longitud (Kochert, 1994; Salinas, 1996 y Soller and Beckman, 1983). Tanto las poblaciones obtenidas por retrocruzamiento como las F_2 , tienen limitaciones para la localización de QTL a causa de la carencia de eventos de recombinación. Lo contrario sucede en poblaciones con múltiples eventos de recombinación, como en las poblaciones de líneas endogámicas recombinantes, en donde los eventos se acumulan aún en poblaciones relativamente

pequeñas sobre el curso de muchas generaciones y se tiene la ventaja de ubicar QTL ligados más estrechamente (Xu, 1997).

Dado que la mayor desventaja de las poblaciones F_2 y de retrocruza es que son efímeras y que, la semilla derivada de la autofecundación de estos individuos no mantiene sus características, es necesario sobrellevar esta limitación mediante cultivo de tejidos o cosecha masiva de plantas F_3 para proporcionar una fuente permanente de material vegetal para aislamiento (Young, 1994). Según Reiter *et al.*, (1992) las poblaciones de retrocruza pueden utilizarse en la localización de marcadores dominantes si todos los loci en el progenitor recurrente son homocigotos, y si los progenitores donador y recurrente, tienen alelos marcadores polimórficos contrastantes. La información obtenida de poblaciones de retrocruza utilizando marcadores codominantes o dominantes es menor que la que se obtiene de poblaciones F_2 , ya que sólo uno de los gametos recombinantes es muestreado (Staub *et al.*, 1996).

2.3.1.3 Poblaciones de líneas endogámicas recombinantes

El uso de poblaciones de líneas endogámicas recombinantes derivadas sin selección de plantas F_2 individuales, son una estrategia excelente para el mapeo genético. Las líneas endogámicas recombinantes permiten localizaciones con mayor precisión con menos individuos que las poblaciones F_2 (Beckmann and Soller, 1986).

El proceso de formación de estas líneas permite que cada una contenga una combinación diferente de bloques de ligamiento de cada progenitor, estos bloques proporcionan la base para el análisis de ligamiento (Young, 1994). Dado que se requieren de seis o más generaciones de autofecundación para llevar las plantas hacia la homocigosidad, las líneas una vez que son homocigotas pueden propagarse por

semilla, los marcadores que se mantienen ligados permanecen juntos durante la autofecundación (Kochert, 1994).

La ventaja principal de estas líneas es que constituyen una población permanente de mapeo por lo que pueden evaluarse en ambientes diferentes (Burr *et al.*, 1988).

2.3.1.4 Poblaciones de líneas dihaploides

Las líneas dihaploides son similares a las líneas endogámicas recombinantes. Estas poblaciones homocigotas se producen a partir del cultivo de anteras de una F_1 , los cromosomas de estas plantas contienen segmentos genómicos derivados de cada uno de los progenitores, ocurre una sola meiosis por lo que no se mejora la resolución si se compara con utilizar una población F_2 . La ventaja es que la población es permanente. La principal desventaja de estas líneas es la baja capacidad para ordenar los marcadores estrechamente ligados (Burr *et al.*, 1988 y Staub *et al.*, 1996).

2.3.2 Progenitores

Es necesario establecer consideraciones al momento de elegir a la fuente de progenitores (por ejemplo adaptado vs exótico) de la población utilizada para mapeo. Entre los padres deben existir secuencias polimórficas, ya que sin éstas el análisis de segregación y la construcción de mapas de ligamiento es imposible. De acuerdo a Kochert (1994), la utilización de líneas endogámicas como progenitores simplifican el análisis genético debido a que la fase (acoplamiento o repulsión) de los marcadores se conoce completamente.

En poblaciones de polinización abierta existe un alto grado de polimorfismo, mientras que en las especies endogámicas los niveles de variación en la secuencia del

DNA son más bajos; en este tipo de poblaciones es necesario que los padres se encuentren lejanamente relacionados. En algunos casos, el requerimiento de DNA con suficientes secuencias polimórficas puede impedir el uso de marcadores de DNA en algunas cruzas estrechas, como por ejemplo entre diferentes variedades de una especie cultivada.

El apareamiento de cromosomas y la recombinación pueden ser alterados en forma severa en cruzas amplias (adaptado X exótico). Las cruzas amplias generalmente proporcionan poblaciones segregantes con un arreglo relativamente grande de polimorfismo, cuando se le compara con una progenie segregante en una craza dirigida (adaptado X adaptado); para tener un valor significativo en los programas de mejoramiento de plantas, un mapa realizado de una craza amplia debe ser colineal a mapas construidos utilizando padres adaptados (Staub *et al.*, 1996).

En el caso del sorgo, debido al grado bajo de polimorfismo entre los progenitores de líneas endogámicas recombinantes, las RFLP no se localizaron, consecuentemente el mapa desarrollado por Tuinstra *et al.*, (1996) quedó incompleto.

En los marcadores RFLP, el problema de falta de polimorfismo puede resolverse con el uso de mayor variedad de enzimas de restricción. En cruzas estrechas, la electroforesis en geles de poliacrilamida puede separar las moléculas del DNA que difieren en un par de bases, resolviendo este problema (Young, 1994).

2.3.3 Tamaño de la población

La precisión del mapa así como la habilidad para determinar el orden de los marcadores dependen del tamaño de la población, por lo que es recomendable aumentar la población tanto como sea necesario dependiendo de los factores técnicos.

Poblaciones menores a cincuenta individuos proporcionan poca precisión, si el objetivo es mayor precisión en la localización de QTL de efecto menor, se requieren poblaciones mucho más grandes (Young *et al.*, 1994). Es más probable que los efectos de QTL pequeños tengan significancia estadística entre más grande sea el tamaño de población. Con un tamaño de muestra típica ($n < 500$) dos o más genes ligados estrechamente (20 cM) son detectados como un QTL simple. En maíz, con un tamaño de muestra de 700 individuos F_2 y umbral de probabilidad de 0.05%, un QTL que contribuye con un 3% de la varianza fenotípica es detectado; con tamaños de muestra pequeños y un umbral más alto de probabilidad, QTL que explican menos del 3% de la varianza fenotípica no se detectan normalmente (Xu, 1997).

Un tamaño de población menor de 100 es suficiente para detectar ligamiento en poblaciones de líneas endogámicas, cuando la frecuencia de recombinación (r) es mayor del 35%; este tamaño de población presenta rangos de segregación no diferentes en forma significativa de la segregación independiente (Koornneef and Stam, 1992).

2.3.4 Análisis de loci

El análisis de un locus simple involucra la estimación de las frecuencias alélicas y genotípicas; el cálculo de la segregación teórica o esperada y la observada y por diferencia entre estas dos, la detección de la distorsión en la segregación. El propósito de éste análisis es determinar si los datos observados se comportan como lo esperado de acuerdo a un modelo genético de un locus simple. En el análisis de dos locus, la detección del ligamiento entre los marcadores y la estimación de la frecuencia de recombinación, son las bases la construcción de un mapa de ligamiento genético (Liu, 1998).

2.3.4.1 Segregación

La determinación de la segregación de cada locus en cada individuo de la población es un paso importante en la generación de los datos moleculares. De acuerdo a la 1ª Ley de Mendel (segregación independiente), para determinar si la segregación de cada locus marcador es mendeliana se realizan pruebas de Chi-cuadrada (χ^2):

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

$$\chi^2 = \sum_{i=0}^n \frac{[(\text{observado}_i - \text{esperado}_i) - 0.5]^2}{\text{esperado}_i} \quad (2)$$

La ecuación 1 se utiliza cuando los grados de libertad son mayores que 1, mientras que la ecuación 2 es utilizada cuando sólo existe 1 grado de libertad (sólo dos clases de genotipos). Los grados de libertad se obtienen del número de clases de genotipos menos 1. Los valores esperados de marcadores dominantes y codominantes

en diferentes tipos de población se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Segregación esperada de los marcadores en diferentes tipos de poblaciones (CIMMYT, 1996)

Población	Marcadores dominantes	Marcadores codominantes
RC ₁ F ₁	1:1	0:1:1 (1:1)
F ₂	3:1 ó 1:3	1:2:1
LER	1:1	1:0:1 (1:1)
DH	1:1	1:0:1 (1:1)

RC₁F₁ = retrocruza 1, LER = líneas endogámicas recombinantes, DH = dobles haploides

La evaluación de las hipótesis involucra la hipótesis nula (H₀), en la cual se asume que no existe diferencia entre los valores observados y los esperados, y la hipótesis alternativa (H₁), la cual asume diferencia entre dichos valores (cuando el valor χ^2 calculado es menor que el valor tabulado se acepta la hipótesis nula).

Los valores de χ^2 calculados son comparados con los valores χ^2 esperados con un cierto nivel de probabilidad basado en los grados de libertad y el nivel de significancia establecido por el investigador (valores tabulados), generalmente se escoge un nivel del 95% (nivel $\alpha = 0.05$) (CIMMYT, 1996 y Liu, 1998). Cuando se utilizan pruebas de χ^2 en genética, debe tomarse en cuenta que sólo deben utilizarse valores numéricos y no porcentajes o rangos derivados de frecuencias; no pueden aplicarse a distribuciones en las que el número de individuos sea menor de 5. En la mayoría de los experimentos de mapeo se puede calcular la segregación de muchos loci utilizando la misma población por lo que se necesitan corregir para utilizar pruebas múltiples (CIMMYT, 1996).

Las distorsiones en la segregación puede deberse a los efectos de dominancia, epistasis y pleiotropía (Staub, 1994). Si la población no segrega como se esperaba, una comparación de los alelos de la población segregante y los alelos de los progenitores pueden confirmar si éstos fueron los adecuados, por lo anterior es recomendable muestrear y almacenar a los progenitores y F_1 con el fin de determinar el origen de los alelos (CIMMYT, 1996).

2.3.4.2 Ligamiento genético

Después de determinar que los marcadores tienen una segregación mendeliana correcta, es necesario determinar si existe ligamiento entre los genes o marcadores. En términos estadísticos, el ligamiento es la asociación, o no independencia, entre dos o más alelos de loci diferentes (Liu, 1998). Cuando los genes se encuentran ligados, significa que están en el mismo cromosoma; sin embargo, el hecho de que dos genes se comporten en forma independiente no prueba que estén localizados en cromosomas diferentes.

2.3.4.2.1 Fases de ligamiento. Existen dos fases de ligamiento que describen el arreglo físico de los loci (genes) ligados en el cromosoma: fase de acoplamiento y fase de repulsión. La fase de acoplamiento se da cuando se encuentran dos alelos recesivos en un cromosoma y dos dominantes en otro (AB/ab), la fase de repulsión se da cuando los alelos presentan un arreglo alternado (Ab/aB). En las cruces de prueba, si la frecuencia de los genotipos AaBb y aabb (por ejemplo para dos alelos) es mayor de lo esperado y la frecuencia de los genotipos Aabb y aaBb es menor de lo esperado, los alelos se encuentran en fase de acoplamiento. Si las frecuencias son menor y mayor de lo esperado, respectivamente, los alelos se encuentran en fase de repulsión (Staub, 1994).

2.3.4.2.2 Métodos matemáticos para detectar ligamiento. Los métodos matemáticos utilizados más frecuentemente para detectar ligamiento entre marcadores, incluyen el de cuadrados mínimos o de regresión y el de máxima verosimilitud. Estos métodos presentan el error estándar más pequeño y pueden utilizarse con grupos de loci múltiples. Los métodos de cuadrados mínimos o de regresión minimizan las desviaciones de un modelo matemático (Staub, 1994). El método de máxima verosimilitud involucra la comparación entre dos ó más hipótesis plausibles (por ejemplo ligamiento vs no ligamiento) (CIMMYT, 1996; Liu, 1998 y Staub, 1994).

El método de máxima verosimilitud puede utilizarse para localizar uno o más loci, es decir, puede determinar si la segregación de los marcadores moleculares está asociada con la segregación de uno o más caracteres fenotípicos poligénicos (QTL) (Staub, 1994).

Diferentes modalidades de los métodos de cuadrados mínimos se pueden utilizar para determinar el ligamiento entre los marcadores. Pruebas de χ^2 entre los

valores de segregación esperados y los observados de los dos marcadores, permiten determinar la independencia de los loci segregantes (Ecuaciones 1 y 2) de acuerdo con la 2ª Ley de Mendel (segregación independiente). La segregación esperada entre dos loci para marcadores dominantes y codominantes en varios tipos de población se encuentran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Valores esperados de segregación entre dos loci marcadores en varias poblaciones (CIMMYT, 1996).

Población	Marcadores dominantes	Marcadores codominantes
RC ₁ F ₁	1:1:1:1	1:1:1:1
F ₂	9:3:3:1	1:2:1:2:4:2:1:2:1
LER	1:1:1:1	1:1:1:1
DH	1:1:1:1	1:1:1:1

RC₁F₁ = retrocruza 1, LER = líneas endogámicas recombinantes, DH = dobles haploides

La hipótesis nula (H₀) asume que no existe ligamiento entre loci (no existe diferencia entre los valores observados y los esperados) y la hipótesis alternativa (H_i) asume ligamiento entre loci (diferencia entre dichos valores). Los grados de libertad y el nivel de significancia se determinan de la manera previamente explicada.

2.3.5 Construcción de grupos de ligamiento

Los criterios que se utilizan para el agrupamiento de los marcadores en grupos de ligamiento son: frecuencia de recombinación, significancia de la fracción de recombinación e información existente del genoma en estudio (Liu, 1998).

2.3.5.1 Distancia genética y frecuencia de recombinación

Si los marcadores están ligados, se calcula la distancia entre ellos. La distancia genética entre los loci de los genes está expresada usualmente en centiMorgans (cM). La unidad de mapeo es la distancia con un porcentaje de recombinación de 1% = 1 cM, y se define como el número promedio de eventos de entrecruzamiento entre dos loci

durante la meiosis (Kearsey and Pooni, 1996; Koornneef and Stam, 1992 y Staub, 1994). Los entrecruzamientos son el camino más simple y fácil para medir la distancia genética entre genes en el cromosoma y para determinar el orden de los mismos (la distancia de recombinación entre dos marcadores se calcula dividiendo el número de recombinaciones detectadas entre el número de eventos meióticos) (Kearsey and Pooni, 1996).

El porcentaje de recombinación en la progenie depende de los eventos de entrecruzamiento, el número de entrecruzamientos dobles son usualmente más pequeños que los predichos debido a la interferencia (ver más adelante) (Staub, 1994). La estimación de la frecuencia de recombinación (r) requiere de muestras grandes ya que debido a que es una proporción su varianza es $r(1-r)/N$ (distribución binomial) (Kearsey and Pooni, 1996). El cálculo de la varianza de diferentes frecuencias de recombinación (r) y tamaños de población (N) se encuentra en el Cuadro 4.

Es importante puntualizar que la distancia de mapeo no es aditiva completamente, entendiéndose por aditividad cuando el número de entrecruzamientos entre dos loci es directamente proporcional a la distancia entre estos. La distancia entre dos loci tiende a ser subestimada por la fracción de recombinación (r) (Staub et al., 1996). La distancia genética y la frecuencia de recombinación no son directamente proporcionales, la segunda se incrementa con la primera; sin embargo, un doblamiento de la distancia genética no resulta de un doblamiento de la frecuencia de recombinación (Koornneef and Stam, 1992). La frecuencia de recombinación entre dos genes no puede ser mayor del 50%, este valor ocurre cuando dos genes se encuentran en diferentes cromosomas o bien cuando ocurre un quiasma en promedio entre dos loci.

Cuadro 4. Cálculo de la varianza (renglón superior) y error estándar (renglón inferior) para diferentes frecuencias de recombinación (r) y tamaños de población (N).

r	N					
	50	100	200	300	400	500
0.05	0.00095 0.03	0.00047 0.02	0.00023 0.015	0.00016 0.012	0.00011 0.01	0.00009 0.009
0.10	0.0018 0.04	0.0009 0.03	0.00045 0.021	0.0003 0.017	0.00022 0.015	0.00018 0.13
0.20	0.0032 0.056	0.0016 0.04	0.0008 0.028	0.0005 0.023	0.0004 0.02	0.00032 0.017
0.30	0.0042 0.064	0.0021 0.045	0.0010 0.032	0.0007 0.026	0.0005 0.022	0.0004 0.02
0.40	0.0048 0.069	0.0024 0.048	0.0012 0.034	0.0008 0.028	0.0006 0.024	0.0004 0.021

Sí los genes se encuentran ligados estrechamente (entre 1-10 cM), la estimación de la distancia genética a través de la frecuencia de recombinación es confiable, en intervalos mayores esto no sucede. Por ejemplo, $r = 0.10$ equivale a 10 cM, $r = 0.30$ equivale a 45.8 cM y $r = 0.35$ equivale a 60.2 cM, por lo que en distancias más grandes (40-50 cM) los genes son independientes (Staub, 1994).

2.3.5.2 Funciones de mapeo e interferencia

La presencia de un evento de recombinación o entrecruzamiento entre dos loci disminuye la frecuencia de entrecruzamientos entre loci adyacentes. Por ejemplo, si se están mapeando los loci A, B y C, la distancia del intervalo A-B más B-C no es igual a la distancia A-C (Kearsey and Pooni, 1994). El problema de no correspondencia entre distancia genética y frecuencia de recombinación (r) se resuelve utilizando funciones de mapeo para calcular la distancia genética. Las funciones de mapeo más comunes son las de Kosambi y Haldane (CIMMYT, 1996).

La función de mapeo es la relación matemática entre la distancia genética y la frecuencia de recombinación (Kooorneef and Stam, 1992 y Staub *et al.*, 1996) y depende del grado asumido de interferencia de entrecruzamiento. La función de Haldane asume ausencia de interferencia, lo cual no es cierto sobre distancias de menos de 15 cM, mientras que la función de Kosambi asume interferencia positiva (Staub, 1994).

Función de mapeo de Kosambi (interferencia, $c = 1$):

$$m = \frac{1}{2} \tanh^{-1} 2r$$

$$\approx \frac{1}{4} \log \left[\frac{(1+2r)}{(1-2r)} \right]$$

de donde, $r = \frac{1}{2} \tanh(2m)$

$$\approx \frac{1}{2} \left[\frac{e^{4m} - 1}{e^{4m} + 1} \right]$$

Función de mapeo de Haldane (no interferencia, $c = 2r$):

$$m = -0.5 \log(1-2r)$$

de donde, $r = 0.5 (1 - e^{-2(m)})$

donde:

m = distancia genética en cM

r = recombinación

\log = logaritmo

\tanh = tangente hiperbólica

Debido a la interferencia, la conversión de fracciones de recombinación a distancias genéticas mediante la fórmula de Haldane será mayor que las distancias de mapeo calculadas por la fórmula de Kosambi, dicha diferencia es mayor a medida que la fracción de recombinación se incrementa (Cuadro 5).

La interferencia describe el efecto de un entrecruzamiento sobre otro que se encuentra en una región adyacente y se mide como el coeficiente de coincidencia (CoC). El coeficiente de coincidencia es una expresión de la relación de dobles

entrecruzamientos observados vs los esperados ($CoC = \text{frecuencia de dobles entrecruzamientos observados} / \text{frecuencia de dobles entrecruzamientos esperados}$) (Staub *et al.*, 1996). Si los entrecruzamientos en dos regiones son independientes, entonces $CoC = 1$, así la interferencia se define como: $I = 1 - CoC$, (Kearsey and Pooni, 1996).

Cuadro 5. Fracciones de recombinación (r) convertidas a distancias genéticas (cM) utilizando las funciones de Haldane y Kosambi.

Función de mapeo	r					
	0.01	0.1	0.2	0.3	0.4	0.45
Haldane (cM)	0.01	0.11	0.26	0.46	0.81	1.96
Kosambi (cM)	0.01	0.10	0.21	0.35	0.55	1.15

La interferencia positiva se presenta cuando los entrecruzamientos dobles observados son menos que los esperados, sugiere que la presencia de un entrecruzamiento en un intervalo limita la formación de un segundo entrecruzamiento en otro intervalo (Kearsey and Pooni, 1996); varía dependiendo del organismo, localización de entrecruzamientos, factores ambientales y otros factores (Staub *et al.*,

1996). La interferencia negativa sugiere sinergismo y se da cuando los entrecruzamientos dobles observados son mayores a los esperados (Kearsey and Pooni, 1996).

2.3.6 Programas computacionales para el análisis de los loci y construcción de mapas de ligamiento genético

Los pasos claves para la construcción de mapas de ligamiento genético y localización de QTL son: el análisis de la segregación de los loci marcadores, el ordenamiento de los marcadores en grupos de ligamiento, el ordenamiento de los genes o regiones del genoma que rigen un carácter en particular y la construcción de

los modelos multilocus. Cuando el número de loci es grande, cada uno de los pasos se vuelve tedioso, por lo que para facilitar esta tarea se han desarrollado varios programas computacionales que además de ser necesarios para implementar los análisis, facilitan los cálculos de los mismos (Liu, 1998).

Algunos de los programas disponibles para el análisis de los loci y construcción de mapas de ligamiento genético se presentan en la Cuadro 6.

Cuadro 6. Programas computacionales para el análisis de loci y construcción de mapas de ligamiento genético.

Nombre	Autor	Función	Población
MapMaker	Eric Lander y Phil Green	Análisis de ligamiento y construcción de mapas	F ₂ , RC, LER, DH
Gmendel	Steve Knapp	Análisis de ligamiento y construcción de mapas	F ₂ , RC, LER, DH
JoinMap	Piet Stam y Johan Van Ooijen	Análisis de ligamiento y construcción de mapas	F ₂ , RC, LER, DH
PGR1	Ben Liu	Análisis de ligamiento, construcción de mapas y unión de mapas (map merging)	F ₂ , RC, LER, DH, PA

RC = retrocruzas, LER = líneas endogámicas recombinantes, DH = dihaploides, PA = polinización abierta

2.3.6.1 MapMaker

MapMaker es el primer programa de un paquete formado por MapMaker y MapMaker/QTL. Es un programa para la construcción de mapas de ligamiento genético escrito por Eric Lander y Phil Green. Realiza el análisis de ligamiento para la construcción de mapas de marcadores segregantes, mediante la estimación simultánea de todas las fracciones de recombinación de los datos en el llamado análisis multipuntual, permite el análisis de marcadores dominantes, recesivos y codominantes (HGMP Resource Center, 1993). Utiliza las funciones de Kosambi y Haldane para calcular las distancias genéticas. Los tipos de población con que puede trabajar este programa se anotan en la Cuadro 6.

2.3.6.2 JoinMap

Este paquete fue desarrollado por Piet Stam y Johan W Van Ooijen para la construcción de mapas de ligamiento, su principal ventaja es que maneja los tipos más comunes de poblaciones (Cuadro 6) y marcadores. Además de las poblaciones del Cuadro 6, JoinMap maneja poblaciones de polinización cruzada (la población de mapeo en este caso es la descendencia de la cruce entre un par simple de padres heterocigotos). Puede utilizar los diferentes tipos de segregación que ocurren en las poblaciones de polinización cruzada; por ejemplo, alelos múltiples y dominancia en el caso de dos alelos segregantes (Stam, 1995).

Otra ventaja de JoinMap es que pueden incluirse datos de porcentaje de recombinación calculados previamente. Al igual que MapMaker utiliza las funciones de Haldane y Kosambi para calcular las distancias genéticas (Koornneef and Stam, 1992).

2.3.6.3 PGRI

El PGRI es un paquete desarrollado en el International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), incluye programas para la construcción de mapas de ligamiento genético, localización de QTL y selección de progenitores y progeñie para GMAPB (Genome Map Assisted Plant Breeding) en modelos de cruce de dos progenitores. El análisis de ligamiento se basa en la teoría de poblaciones mixtas con cruzamientos al azar y autofecundación. El ordenamiento de los genes se basa en un algoritmo que combina ramas y enlaces y alineación simultánea. Su intervalo de confianza se cuantifica utilizando el porcentaje de los ordenes correctos obtenido por bootstrapping de los datos originales (Liu, 1998).

Para modelos simples de QTL, el QTL se localiza por una regresión no lineal entre un par de marcadores flanqueadores y el QTL putativo. Para modelos múltiples, se buscan interacciones de dos y tres vías y se construyen modelos utilizando un

procedimiento similar a la regresión por pasos (Liu, 1998). Los tipos de población que se pueden analizar con este programa se encuentran en los Cuadros 5 y 6.

2.4 Localización de QTL (Quantitative Trait Loci ó loci de carácter cuantitativo)

2.4.1 Definición de QTL

La mayoría de los caracteres de interés agronómico están controlados por muchos genes cuyos efectos individuales son pequeños y acumulativos (genes menores) (Kearsey and Pooni, 1996). Estos genes pueden tener contribución positiva o negativa en el valor final fenotípico del carácter (Beckmann and Soller, 1986). Un QTL (quantitative trait locus/loci) o "locus o loci de caracteres cuantitativos" puede definirse como la región del genoma que controla la expresión de caracteres cuantitativos.

La localización de QTL permite identificar regiones del cromosoma que contienen los genes que afectan los caracteres cuantitativos. Su función es ligar la variación de estos caracteres a la variación de los marcadores genéticos en términos de números, efectos e interacción de los genes que los afectan. El primer reporte de ligamiento de un QTL a un gen mayor fue reportado por Sax en 1923, él estudió la herencia del peso y color de la semilla de frijol *Phaseolus vulgaris* utilizando poblaciones F₂. Durante los siguientes 60 años se continuó con el estudio de genes mutantes para identificar partes o cromosomas que afectan a los caracteres cuantitativos en *Drosophila* y trigo (Kearsey and Pooni, 1996).

Para localizar QTL se requieren de dos tipos de datos: los datos moleculares (marcadores) que no afectan directamente a los caracteres cuantitativos (pero que segregan junto con los genes de los caracteres cuantitativos) y los datos fenotípicos de los caracteres cuantitativos (CIMMYT, 1996).

Las medidas fenotípicas deben transformarse matemáticamente, de tal manera que los fenotipos de los progenitores tengan una distribución normal. La habilidad para mapear QTL depende de la magnitud del efecto fenotípico del carácter cuantitativo, mientras más pequeño sea el efecto se requiere de una población mayor (Lander and Botstein, 1989).

2.4.2 Diseños experimentales y métodos estadísticos para la localización de QTL

Los diseños experimentales más eficientes para la detección de QTL son los que involucran cruza entre líneas endogámicas que difieren en los valores para el carácter de interés, así como en los alelos de los marcadores que portan debido a que el desequilibrio de ligamiento entre marcador y QTL se maximiza en la F_1 (CIMMYT, 1996 y Lander and Botstein, 1989).

El desequilibrio de ligamiento ocurre cuando la frecuencia de gametos con genes en fase de repulsión no es la misma que en fase de acoplamiento (Staub, 1994). Es importante señalar que se requieren de individuos heterocigotes (progenitores) para romper los bloques de ligamiento mediante la recombinación de dichos individuos (se recupera el equilibrio de ligamiento) (Staub, 1994).

En el ligamiento entre el marcador y QTL pueden presentarse dos tipos de errores: el error tipo 1 ocurre cuando se detecta un falso positivo (ligamiento no está presente pero es significativo estadísticamente, el error tipo 2 ocurre cuando se esconden los efectos reales (ligamiento está presente pero no se obtiene diferencia significativa) (Beckmann and Soller, 1986).

Los métodos estadísticos propuestos más utilizados para localizar QTL y estimar sus efectos son el análisis de regresión del marcador (análisis de un marcador) y el mapeo por intervalo.

2.4.2.1 Análisis de regresión (análisis de marcador individual)

El análisis de regresión es el método tradicional para detectar QTL, involucra la comparación de las medias fenotípicas utilizando como variable clasificatoria los alelos del marcador; la diferencia entre las medias, es un estimador del efecto fenotípico de la sustitución de un alelo por otro en el QTL (Lander and Botstein, 1989). En este método se calcula la regresión del carácter cuantitativo (variable Y) sobre el marcador (variable X), de tal forma que los marcadores se tratan como si fueran QTL. Se asume que los efectos de estos son absorbidos o representados por los marcadores ligados. Los marcadores se analizan uno por uno (Jansen, 1993).

Un problema importante del análisis de regresión, estriba en la pérdida de información en términos de modelos genéticos, los inconvenientes de este método son que el efecto fenotípico puede ser subestimado si el QTL no se orienta en el locus marcador (se confunden los efectos del QTL con la frecuencia de recombinación entre el marcador y éste), se requiere un mayor número de progenie, no se define la posición probable del QTL (no se distingue entre ligamiento para QTL con efecto pequeño), no se distingue si el marcador está asociado con uno o varios QTL y no se estima la posición probable del QTL (Lander and Botstein, 1989).

2.4.2.2 Método de localización por intervalo

La localización por intervalo es el método utilizado más frecuentemente para análisis de QTL. En otros métodos de análisis de QTL se asume incorrectamente que el QTL se encuentra exactamente en el locus marcador, por lo que el uso de diferencias entre medias fenotípicas confunde el tamaño del efecto del QTL con la distancia real entre el QTL y el marcador (Martínez and Cumow, 1992).

Lander and Botstein (1989) proponen el método de localización por intervalo mediante el uso de un par de marcadores contiguos para distinguir entre la frecuencia

de recombinación, el efecto aditivo y el efecto de dominancia utilizando procedimientos de máxima verosimilitud. El método del intervalo fue desarrollado para tomar ventaja de información adicional provista por mapas de ligamiento que tengan un grado relativamente alto de saturación del genoma (marcadores cada 5-20 cM por ejemplo). El método permite la estimación de efectos de QTL putativos en cualquier lugar, dentro de un intervalo entre marcadores, basándose en las medias y varianzas del carácter cuantitativo observadas en las clases (definidas por los alelos de los marcadores) y la frecuencia de recombinación de los marcadores en un intervalo en particular (Lander and Botstein, 1989).

El principio del método de localización por intervalo es probar la hipótesis para la presencia de un QTL en muchas posiciones entre los dos loci marcadores contiguos (Lander and Botstein, 1989). Se calcula para cada intervalo del cromosoma el valor LOD (logaritmo de los odds) para la hipótesis de que un QTL se encuentra dentro de una posición específica del intervalo vs la hipótesis de que no se encuentra (Martínez and Curnow, 1992).

El LOD es abreviación del logaritmo de las probabilidades o nomios (relación entre verosimilitudes) y se define como logaritmo base 10 de una relación de verosimilitud:

$$Z = \log_{10} [L(\theta_A/x) / L(\theta_N/x)]$$

y su interpretación es que la hipótesis alternativa es 10^z veces más probable que la hipótesis nula, por ejemplo si el LOD score es igual a 2 (antilog = 100) significa que es 100 veces más probable la hipótesis alternativa con respecto a la hipótesis nula (Liu, 1998).

El valor LOD está en función de la posición dentro del intervalo y del tamaño del efecto del QTL bajo hipótesis, el tamaño del efecto se estima graficando todas las posiciones posibles del QTL y el valor LOD máximo resultante (Martínez and Curnow,

1992). Se dice que el QTL está presente cuando el valor LOD maximizado excede algún valor "umbral" (Lander and Botstein, 1989). Los QTL son localizados uno por uno, ignorando los efectos de otros QTL (Jansen, 1993).

Las ventajas del método de intervalo son: 1) la verosimilitud del QTL localizado representa claramente la fuerte evidencia para QTL en varios puntos a lo largo del cromosoma, 2) en contraste a los métodos tradicionales, los efectos de interferencia fenotípica están asintóticamente desviados; 3) la posición probable del QTL está dada por intervalos soporte que indican el rango de puntos para los cuales el rango de verosimilitud está dentro de un factor de 10 del máximo y 4) se requiere de menor tamaño de progenies que en los métodos tradicionales para detección de QTL (Lander and Botstein, 1989). En un mapa con marcadores cada 52 cM, se necesita cerca de 40% menos individuos para detectar ligamiento de un carácter dominante y 60% menos para un carácter recesivo, en comparación con el método de marcadores individuales (Lander and Botstein, 1986).

Las desventajas de este método de localización de QTL son que no permite probar marcadores que no están ligados, ni localizar en forma precisa QTL más allá de los marcadores terminales de un grupo de ligamiento dado (Staub *et al.*, 1996). Además, cuando hay más de un QTL en el cromosoma la prueba estadística de la posición de un QTL determinado es afectada por los demás QTL por lo que, las posiciones estimadas están desviadas (Staub, 1994).

2.4.2.3 Mapeo de QTL múltiples

Para el caso de los QTL múltiples, se han sugerido métodos que combinan tanto el método de intervalo de mapeo como el de análisis de regresión. La consideración de todos los loci marcadores a la vez durante el análisis de QTL es compleja e involucra la regresión de expresión de caracteres en valores de locus de

marcadores múltiples. El mapeo de intervalo y regresión múltiple han sido integrados para describir de manera más precisa las asociaciones QTL/carácter (Staub *et al.*, 1996).

Jansen (1992) sugirió un modelo general mezclado para el caso de QTL múltiples (localización por intervalo y método de regresión múltiple), propuso fijar modelos de QTL simples (uno por intervalo de marcador) y seleccionar marcadores para eliminar los efectos de posibles QTL en otros intervalos (se utilizan marcadores como cofactores en la regresión del fenotipo en el genotipo). Knapp (1991), Martínez and Curnow (1992) y Jiang and Zeng (1995) han sugerido modelos similares.

2.4.3 Programas computacionales para localización de QTL

Algunos de los programas computacionales disponibles para la localización de QTL se encuentran en la Cuadro 7.

2.4.3.1 MapMaker/QTL

MapMaker/QTL es el segundo programa del paquete MapMaker y MapMaker/QTL. Fue desarrollado por Eric Lander junto con David Botstein y permite la localización de genes que controlan caracteres cuantitativos. A diferencia de MapMaker, sólo trabaja con poblaciones F_2 y retrocruzas (RC) que se encuentran relacionadas a mapas de ligamiento previamente construidos con MapMaker (Lander, 1992).

Cuadro 7. Programas computacionales disponibles para la localización de QTL.

Nombre	Autor	Método	Población
MapMaker/QTL	Eric Lander y David Botstein	Intervalo de mapeo, modelo de QTL múltiple	F ₂ , RC
QTLTAT	Steve Knapp	Intervalo de mapeo por regresión no lineal	F ₂ , RC, LER, DH
PGRI	Ben Liu	Pruebas de t, regresión lineal, QTL múltiples, pruebas de permutación	F ₂ , RC, LER, DH, PA
QTL Cartographer	Christopher Basten	Pruebas de t, intervalo de mapeo compuesto, pruebas de permutación, bootstrap, jackknife	F ₂ , RC, LER, DH
MAPQTL	Johan Van Ooijen	Intervalo de mapeo, MQM, mapeo no paramétrico	F ₂ , RC, LER, DH
QGene	James C. Nelson	Regresión lineal, regresión múltiple	F ₂ , RC

RC = retrocruzas, LER = líneas endogámicas recombinantes, DH = dobles haploides, PA = polinización abierta

MapMaker/QTL utiliza las técnicas de localización por intervalo y la de "búsqueda simultánea", la localización por intervalo distingue los efectos débiles de un QTL de la distancia genética entre el marcador y el QTL, mientras que la búsqueda simultánea permite fijar QTL múltiples en el genoma, esto reduce la varianza no genética en el carácter. El uso de ambas técnicas incrementa el poder de detección de QTL permitiendo localizar genes con efectos pequeños (HGMP Resource Center, 1993).

2.4.3.2 QTLCartographer

QTLCartographer fue desarrollado por Chris Basten, Bruce Weir y Zhao-Bang Zeng, localiza QTL utilizando regresión lineal, localización por intervalo o intervalo compuesto de mapeo. La localización se lleva a cabo en un mapa de ligamiento con frecuencias de recombinación conocidas, el mapa de ligamiento puede ser importado desde MapMaker; además de los métodos utilizados por el programa (Cuadro 7) otros diseños experimentales pueden incorporarse con facilidad (Basten *et al.*, 1995 y

Yandell, 1995). Los tipos de población que se pueden analizar se reportan en el Cuadro 7.

El algoritmo utilizado por QTLCartographer permite que una gran cantidad de modelos estadísticos sean implementados y comparados incluyendo acciones de varios genes (aditivo y dominancia), interacciones QTL-ambiente, efectos pleiotrópicos y ligamiento estrecho (Basten *et al.*, 1995).

2.4.3.3 QGene

QGene es un programa escrito para la visualización y análisis estadístico rápido de datos moleculares y de caracteres fenotípicos; de forma simple y rápida conforma análisis de regresión lineal simple y regresión lineal múltiple de caracteres utilizando los marcadores y sus interacciones. De igual forma realiza análisis de intervalo y pruebas de permutación para localizar QTL en el genoma (Nelson, 2000). Algunas de las funciones que realiza son semejantes a las realizadas por MapMaker y MapMaker/QTL.

Otra de las características de QGene es que genera mapas simulados y poblaciones basadas en éstos y especifica el número de cromosomas y marcadores, número de QTL, acción de los genes. Además, permite la construcción de un índice de selección elemental en los alelos marcadores y evalúa la probabilidad de generar líneas cuasiisogénicas por selección de regiones del genoma. El ordenamiento de los locus y la localización por intervalo compuesto son dos características que QGene no puede realizar (Nelson, 2000).

2.4.3.4 Map Manager QT

Map Manager QT es un programa originado en el Roswell Park Cancer Institute y se encuentran aún en etapa de prueba por lo que no está incluido en la Cuadro 7.

Consta de funciones básicas para el ingreso, edición y despliegue de caracteres cuantitativos, tiene tres funciones para la identificación y localización de posibles QTL. Utiliza el método de regresión por intervalo para localizar los QTL dentro de los intervalos definidos por los marcadores, puede agregar regresión múltiple al método antes mencionado; proporciona pruebas de permutación para asegurar la significancia estadística de cualquier QTL putativo (Roswell Park Cancer Institute, 2000).

2.5 Mapas de sorgo

Uno de los primeros mapas de ligamiento genético para sorgo fue desarrollado por Hulbert *et al.* (1990) con sondas de maíz. La mayoría de los mapas de sorgo han sido construidos con sondas de maíz o de otras especies pertenecientes a la familia de las gramíneas como arroz, avena y cebada. Los primeros mapas se construyeron con el fin de comparar los genomas de maíz y sorgo. Pereira y Lee (1994), además de construir un mapa de ligamiento, identificaron regiones del genoma que controlan la altura de planta en maíz y sorgo (QTL), haciendo así una comparación de regiones ortólogas en el genoma de ambas especies.

El sorgo es un cultivo con un grado bajo de polimorfismo, Tao *et al.* (1993) han concluido con base en sus estudios de polimorfismo en sorgo, que el cultivo presenta un nivel alto de uniformidad genética, por este motivo algunos investigadores han utilizado diferentes tipos de marcadores moleculares con el fin de incrementar el polimorfismo.

Hulbert *et al.* (1990) encontraron en sorgo con marcadores RFLP, suficiente nivel de polimorfismo para establecer grupos o pares de locus ligados, que les permitieron ordenar los genes en éstas áreas del genoma para ser comparado con el

del maíz. Binelle *et al.* (1992) encontraron un grado de polimorfismo bajo (36.5%) con estos mismos marcadores. Un nivel de polimorfismo menor al 20% evaluando 36 accesiones de sorgo fue encontrado por Ludlow *et al.* (1993).

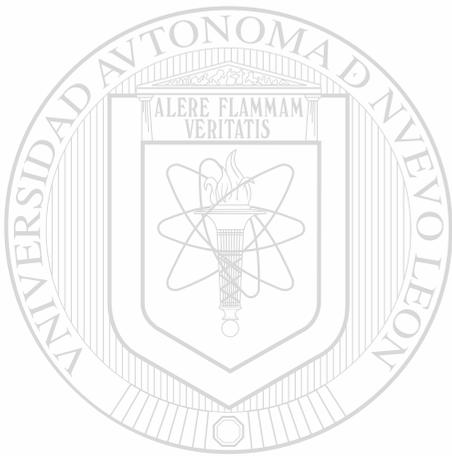
Debido al problema de bajo polimorfismo en el sorgo se han desarrollado RAPD que permiten la posibilidad de incrementar los niveles de polimorfismo entre líneas (Tarchini *et al.*, 1993). Con respecto a este punto, existen autores que no están de acuerdo, Tao *et al.* (1993) encontraron que las frecuencias polimórficas detectadas por RFLP y RAPD en sorgo son similares, diferencias pequeñas ocurren en el DNA en el sitio de unión de la enzima de restricción para un RFLP y en el sitio de unión del iniciador para un RAPD.

La combinación de RFLP, RAPD e ISSR han permitido detectar suficiente polimorfismo y obtener marcadores para determinar la relación entre 84 líneas de sorgo diferentes (de Oliveira *et al.*, 1996). Yang *et al.* (1996) encontraron que de 65 bandas de RFLP, 90 bandas de RAPD y 93 bandas de ISSR sólo el 55%, el 25% y el 44%, respectivamente, fueron polimórficas durante el estudio de comparación de tecnologías de marcadores de DNA.

Con base en estos trabajos, puede concluirse que la utilización combinada de los marcadores permite mayor cubrimiento del genoma al detectar más polimorfismo dentro del mismo. Como una posible solución al bajo polimorfismo en el sorgo Taramino *et al.* (1997) han demostrado que la utilización de SSR puede mejorar el análisis genético, dado el alto nivel de polimorfismo de este sistema de marcadores; además, reduce los espacios ó “huecos” de los mapas de sorgo existentes construidos con RFLP.

En el Cuadro 8 se presenta un resumen de los mapas de sorgo reportados con el tipo de marcador utilizado, número de loci marcadores en el mapa, longitud en cM del mismo, grupos de ligamiento formados, tipo y tamaño de población así como del

objetivo del desarrollo de cada uno de los mapas. Aún y con la construcción de los mapas de ligamiento reportados, no se ha construido un mapa de ligamiento completo y funcional con 10 grupos de ligamiento.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cuadro 8. Mapas de sorgo publicados.

Autor	Año	Tipo y no. marcador	Tipo población	Tamaño pob.	G.L.	Longitud (cM)	Objetivo
Hulbert <i>et al.</i> ^{1,11}	1990	RFLP	F _{2:3}	55	5	-	Mapeo genético y caracterización de sorgo con sondas de maíz
Whitkus <i>et al.</i> ⁶	1992	RFLP (85), isoenzimas (7)	F ₂	81	13	949	Mapeo comparativo entre sorgo y maíz
Melake-Berhan <i>et al.</i> ⁵	1993	RFLP (96)	F _{2:3}	55	15	709	Comparación de la estructura de los genomas de sorgo y maíz
Ragab <i>et al.</i> ⁹	1994	RFLP (71)	F _{2:3}	93	15	633	Construcción de mapa de ligamiento utilizando sondas de maíz y sorgo
Xu <i>et al.</i> ^{3,7}	1994	RFLP (190)	F ₂	50	14	1789	Construcción de un mapa de ligamiento de sorgo con RFLPs
Pammi <i>et al.</i>	1994	RFLP, RAPD (10)	F ₂	50	-	-	Utilización de RAPDs y mapeo de los mismos en sorgo en el mapa construido por Xu <i>et al.</i> (1994)
Pereira <i>et al.</i> ⁴	1994	RFLP (201)	F ₂	78	10	1530	Construcción de un mapa de ligamiento en sorgo y mapeo comparativo con maíz
Benneisen and Melake-Berhan ⁸	1994	RFLP (104)	F _{2:3}	55	11	525	Construcción de un mapa de ligamiento de sorgo
Chittenden <i>et al.</i> ⁶	1994	RFLP (276)	F ₂	56	10	1445	Construcción de un mapa de ligamiento para mapeo de alta densidad
Pereira and Lee ⁵	1995	RFLP (111)	F ₂	152	10	1299	Construcción de un mapa de ligamiento para localización de QTLs que afectan la altura de planta en sorgo y maíz h
Dufuor <i>et al.</i>	1996	RFLP (42)	LER	110	3	-	Mapeo comparativo entre segmentos duplicados de los cromosomas 3 y 8 de maíz para sorgo y caña de azúcar
Peng <i>et al.</i> ⁵	1999	RFLP (323)	LER (F _{e-e})	137	10	1347	Construcción de mapa de ligamiento de sorgo con sondas de sorgo, maíz, avena, arroz y cebada

G.L. = grupos de ligamiento, LER = líneas endogámicas recombinantes

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Etapa de campo

El trabajo se realizó en el Campo Experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL) en Marín, N.L, ubicada a 25° 53' latitud norte y 100° 03' latitud oeste, con una altitud de 375 msnm.

Se utilizó una población de 80 familias F_3 derivadas de la cruce de los progenitores SJ7 X 22830, ambos progenitores son precoces aunque el segundo es poco más tardío; son contrastantes para el tamaño de grano siendo 22830 más grande y SJ7 más pequeño. Se estableció la siembra de los progenitores, F_1 y F_3 durante los ciclos de Otoño-Invierno (O-I) 1997 y Primavera-Verano (P-V) 1998 (dos ambientes) bajo un diseño de repeticiones dentro de bloques, con dos repeticiones. En el Cuadro

1A del Apéndice se encuentra la aleatorización de las familias dentro de cada bloque. En cada ciclo o ambiente se sembraron ocho bloques con diez familias cada uno. Las variables evaluadas fueron: altura de planta (AP) en cm, excursión (Exc) en cm, longitud de panoja (LP) en cm, días a floración (DF), días a madurez fisiológica (DMF) y rendimiento por planta (RP) en g/planta.

En el ciclo O-I 1997 se perdieron los bloques dos y tres por bajas temperaturas, por lo que no se pudieron evaluar las variables DMF, RP y PH consideradas originalmente. Para la medición de todas las variables se utilizaron diez plantas por familia con excepción de: 1) DF la cual se determinó cuando el 50% de las plantas de la parcela presentaban un 50% de floración y 2) DMF la cual se estimó cuando el 50%

de las plantas presentaban 2/3 de la panoja en madurez fisiológica (MF). En el ciclo P-V 1998 se midieron todas las variables de la forma descrita.

3.2 Etapa de laboratorio

La etapa de laboratorio se llevó a cabo en los laboratorios de Biotecnología Microbiana, Fisiología Vegetal y Genética de la FAUANL. La selección de sondas se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular Aplicada (LGMA) del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) bajo la supervisión de la Dra. Mireille Khairallah.

3.2.1 Colecta de material vegetal

Para realizar la extracción de DNA se colectó tejido vegetal de diez plantas (seleccionadas al azar) por familia, se cortaron las hojas más jóvenes de las plantas (una de cada planta) y se colocaron en una bolsa de polietileno. La colecta del material vegetal se llevó a cabo con guantes para evitar la contaminación del tejido con las RNAsas presentes en las manos, las muestras se conservaron en hielo hasta el momento de molerse con nitrógeno líquido (Protocolo 1) o se congelaron a -80°C durante ocho horas para posteriormente liofilizarse por 48 horas y finalmente molerse (Protocolo 2). La colecta del material en campo se realizó cuando la planta se encontraba en etapa de floración. Con el fin de realizar nuevas extracciones, se sembraron nuevamente algunas familias en invernadero durante el ciclo P-V 1999, el tejido se colectó cuando las plantas tenían tres semanas de edad.

3.2.2 Extracción y cuantificación de DNA

Para realizar las extracciones de DNA se utilizaron dos métodos. Para las líneas sembradas durante los dos ciclos agrícolas se realizó mediante el método del CTAB modificado (Protocolo 1). Para la extracción de las plantas de invernadero se realizó por el método de Saghai-Marooif *et al.* (1984) modificado por Hoisington *et al.*, (1994) (Protocolo 2). Lo anterior fue debido a las bajas concentraciones de DNA obtenidas con el método del CTAB modificado.

Una vez realizada la extracción del DNA, se procedió a la cuantificación por fluorimetría de las mismas (Minifluorímetro TKO 100) con el fin de determinar la concentración de DNA (Protocolo 3). La concentración de cada muestra se ajustó a 0.5 µg/µl para RFLP. Para SSR se realizaron diluciones a 10 ng/µl.

3.2.3 Generación de marcadores tipo RFLP

3.2.3.1 Digestión y electroforesis del DNA genómico de sorgo con endonucleasas

Para llevar a cabo la selección de sondas en la detección de polimorfismos, se construyeron membranas con DNA de los progenitores, digerido con las enzimas de restricción *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *DraI* y *EcoRV* (2.5 U/µg de DNA). La reacción de digestión se realizó en un volumen de 30 µl (Protocolo 4). Se cargaron 10 µg de DNA digerido por carril en el gel de agarosa. Los fragmentos de DNA digerido se separaron por electroforesis (20 mA por 16-18 horas) en geles de agarosa al 0.8%. Para visualizar el DNA se tiñó el gel con bromuro de etidio (EtBr) 1 µg/ml (Protocolo 5).

El primer carril de cada membrana, tanto en las membranas de los progenitores como en las membranas de la población segregante, correspondió al marcador de peso molecular λ -*HindIII* etiquetado con digoxigenina-dUTP (Protocolo 6). En la

construcción de las membranas de los progenitores y de la población se utilizó membrana de nylon sin carga. La transferencia del DNA digerido de los geles de agarosa a las membranas de nylon se realizó por el método de Southern (Protocolo 7).

3.2.3.2 Recuperación y etiquetado de sondas

Para realizar las hibridaciones de ácidos nucleicos se utilizaron sondas de maíz proporcionadas por el Maize-RFLP Laboratory de la Universidad de Missouri-Columbia. En el Cuadro 9 se describen las sondas probadas, el cromosoma de maíz donde se localizan y el tamaño del inserto de cada una. Para la recuperación de las sondas, los stabs de agar con las bacterias se cultivaron en agar LB (Luria Broth) a 37°C por una noche y posteriormente se subcultivaron en medio líquido LB a 37°C por una noche (Protocolo 8). La recuperación de los plásmidos con las sondas se llevó a cabo mediante mini-preps (Protocolo 9) y su cuantificación se realizó por fluorimetría (Protocolo 3). La concentración de las sondas se ajustó a 5 ng/μl.

El etiquetado de las sondas con digoxigenina-dUTP se realizó por PCR en un volumen de 100 μl por reacción. La mezcla de reacción y el programa térmico se encuentran en el Protocolo 10; los iniciadores utilizados fueron los M13 universal y reversa (Operon Technologies, Inc). La detección de digoxigenina-dUTP en las sondas se realizó de acuerdo a lo establecido en el Protocolo 11 utilizando membrana cargada positivamente. Durante esta etapa se probaron dos marcas de cubiertas plásticas (Reynolds y Kleen Pack). La cubierta plástica se utiliza para cubrir la membrana antes de exponerla a la película de rayos X (ver Protocolo 11 y 12) con el fin de disminuir el "background" o fondo oscuro de las autoradiografías. Para determinar la concentración de digoxigenina-dUTP a utilizar en las hibridaciones, se realizó una prueba de etiquetado con concentraciones de 2.5 y 5% con las sondas umc6, umc34, umc44, umc128, umc132 y umc152. Para el caso del etiquetado de sondas y su detección, se

utilizó membrana cargada, que aunque produjo interferencia, permitió la detección de la digoxigenina-dUTP.

3.2.3.3 Hibridaciones

Las hibridaciones se realizaron de acuerdo a lo establecido en el Protocolo 12, la temperatura y el tiempo de hibridación fue de 65°C por 18-20 horas con 130 ng de sonda etiquetada con digoxigenina-dUTP por mililitro de solución de hibridación. Esta concentración de sonda se utilizó en el primer uso de la membrana. Con cada uso de la membrana, la concentración original se aumentó 20 ng. Así, por ejemplo, para el segundo uso de la membrana se utilizaron 150 ng/ml de solución de hibridación. El compuesto quimioluminiscente utilizado para la detección de la digoxigenina-dUTP fue el CSPD. Para la obtención de las autoradiografías, las membranas se colocaron en cassettes de exposición con una película de rayos X durante toda la noche (Protocolo 12). Para procesar las autoradiografías se colocaron en la solución reveladora por cuatro minutos, se lavaron en agua por 1 minuto, se colocaron en solución fijadora por dos minutos y finalmente se lavaron en agua corriente por un minuto.

Con los resultados de la selección de sondas en los progenitores, se determinó construir membranas de toda la población utilizando las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. Las sondas se etiquetaron con 2.5% de digoxigenina-dUTP. La digestión del DNA genómico de la población, electroforesis, transferencia Southern, etiquetado de sondas, hibridación y obtención de autoradiografías se realizaron de las formas previamente descritas.

El lavado de las membranas después de cada hibridación para su re-uso se realizó de acuerdo al Protocolo 13. Las membranas disponibles conteniendo el DNA de la población se usaron en un máximo de cuatro hibridaciones. En la Figura 1, se observan las etapas involucradas en la generación de RFLP.

3.2.4 Generación de marcadores SSR o Microsatélites

Para la generación de los SSR se utilizaron los iniciadores reportados por Taramino *et al.* (1997) como polimórficos. Para corroborar los polimorfismos de los iniciadores, así como para determinar las temperaturas de alineación de los mismos y programas térmicos, se realizaron pruebas con los progenitores de la población. Se probaron temperaturas de alineación de 54°C (Taramino *et al.*, 1997), 45, 50 y 52°C. En el programa térmico se probaron repeticiones de 30, 35, 40, 45 ciclos. El procedimiento, los componentes de la mezcla de reacción y el programa térmico utilizado se presentan en el Protocolo 14. Los iniciadores utilizados y sus secuencias se encuentran en el Cuadro 12.

Para visualizar los polimorfismos, se separaron los productos de amplificación por electroforesis (80 volts por tres horas) en geles de agarosa al 3% (0.5 de agarosa normal y 0.5 de agarosa de alta resolución) teñido con EtBr (5 µl de 10 mg/ml de EtBr por cada 100 ml de volumen de gel). Para el caso del iniciador SbAGA01 la concentración del gel de agarosa fue del 4% para obtener mayor resolución, debido a

que el tamaño de banda de cada progenitor fue muy parecido. La toma de fotografías y análisis de las bandas se realizó con el programa Kodak Digital Science 1D™.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.3 Análisis de datos fenotípicos

Durante el ciclo O-I 97 se perdieron los bloques dos y tres en las dos repeticiones, por lo que los análisis de los ambientes se hicieron por separado. El modelo estadístico del diseño en los dos ambientes fue:

$$Y_{ijk} = \mu + b_j + r(b)_j + f(b)_k + \epsilon_{ijk}$$

donde:

μ = media general,

b_i = efecto del i -ésimo bloque,

r_j = efecto de la j -ésima repetición dentro de bloques,

f_k = efecto de la k -ésima familia dentro de bloques, y

ε_{ijkl} = error experimental.

El análisis de los datos se realizó con el programa SAS (Statistical Analysis System). La comparación de medias para las variables significativas en el ANVA se realizó con el mismo programa mediante la prueba de Duncan con la modalidad de diferente número de repeticiones. Se realizaron análisis de correlación entre las variables con un $\alpha = 0.01$.

3.4 Análisis de datos moleculares (construcción del mapa de ligamiento genético y localización de QTL)

Para la construcción del mapa de ligamiento genético se utilizaron los datos moleculares de todas las familias. Mediante pruebas de χ^2 se determinó la distorsión de segregación de los marcadores moleculares, la fórmula utilizada fue:

$$\chi^2 = \sum_{l=0}^n \frac{(\text{observado}_l - \text{esperado}_l)^2}{\text{esperado}}$$

Para la detección de QTL en los dos ciclos agrícolas, se utilizaron solamente aquellos datos moleculares que contaban con sus respectivos datos fenotípicos (medias de las variables), por lo que se integraron dos matrices (una para cada ciclo) con los datos fenotípicos y la segregación de cada marcador molecular en cada familia. La segregación de los marcadores se codificó en las matrices (una para cada

ambiente) de acuerdo a lo establecido por el programa MapMaker/Exp 3.0 y MapMaker/QTL quedando de la siguiente manera:

A = homocigote para el alelo del progenitor 22830

B = homocigote para el alelo del progenitor SJ7

H = heterocigote con los alelos de 22830 y SJ7

- = dato perdido o no definido

Para la construcción del mapa de ligamiento se utilizó el programa MapMaker/Exp 3.0. Los loci se asignaron a los grupos de ligamiento con un LOD de 2.0 y 3.0 así como distancia genética máxima de 50 cM calculada por la función de Kosambi. Los comandos utilizados para la construcción de los grupos de ligamiento fueron: "group" (two point, calcula las recombinaciones entre pares de marcadores), "compare" (en el caso de más de dos marcadores por grupo de ligamiento), "make chromosome", "anchor", "assign" y "frame".

Los grupos de ligamiento generados con MapMaker se utilizaron para la localización de QTL con el programa MapMaker/QTL versión 2.0, en cada variable se realizó el barrido (scan) con un LOD de 2.0, y 3.0. Una vez que se detectó un QTL se

utilizaron los comandos "scan" y "show peaks" para determinar el valor LOD. Para determinar la localización exacta del QTL en el grupo de ligamiento se utilizó el comando "map". La identificación de QTL con los marcadores que no se asignaron a los grupos de ligamiento, se realizó por medio del método de marcadores individuales ($\alpha = 0.05$ y 0.01).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

Debido a que no se contaba con las plantas F_2 se establecieron las familias F_3 para la evaluación y análisis; sin embargo, la población de trabajo fue efímera y se necesitaba una fuente permanente de DNA dado que se estaba ajustando el método de extracción. Las primeras extracciones de DNA se realizaron en tejido maduro lo que disminuyó el rendimiento en el proceso de extracción. Durante el ciclo O-I 1997, las familias estuvieron sometidas a temperaturas bajo cero debido que se presentó una helada temprana por lo que no fue posible evaluar las variables de DMF y RP.

Durante el ciclo P-V 1998 fue necesario recuperar la semilla restante y establecer la siembra en invernadero para contar con tejido vegetal joven para la extracción de DNA. Este tejido se colectó, liofilizó y molió con el fin de almacenarse como fuente permanente de DNA.

4.1 Etapa de Laboratorio

4.1.1 Extracción de DNA

Debido a que las primeras extracciones se realizaron en tejido maduro (plantas en etapa de floración) y a que se utilizó nitrógeno líquido para moler el tejido, la concentración del DNA obtenido fue más baja que cuando se realizó en tejido joven (plantas de tres semanas) liofilizado. En el Cuadro 9 se compara la concentración del DNA obtenido ($\mu\text{g/ml}$) de progenitores y algunas familias F_3 , cuando se utilizó tejido de las dos edades de muestreo. La concentración obtenida con el tejido joven fue mayor a

la obtenida con el tejido maduro. La edad del tejido no fue el único factor responsable de la concentración de DNA, el método de molido del tejido fue también un factor importante. En el caso de tejido joven, este fue liofilizado y molido hasta convertirlo prácticamente en un fino polvo. En el caso del tejido maduro, este fue congelado con nitrógeno líquido, obteniendo partículas de mayor tamaño, el cual dependía de la fuerza aplicada en el proceso. La presencia de nervaduras lignificadas de las hojas dificultó la molienda e impidió obtener un tamaño reducido de partícula, con lo que posiblemente se redujo la eficiencia del protocolo de extracción de DNA utilizado (Protocolo 1).

Cuadro 9. Concentraciones de DNA de los progenitores y de algunas familias ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) obtenidas en dos etapas de desarrollo y con dos métodos de extracción.

Muestra	Concentración en tejido maduro (Método del CTAB) ¹	Concentración en tejido joven (Método de Saghai-Maroo) ²
22830	0.230	0.752
SJ7	0.093	0.775
27	0.085	0.175
36	0.127	0.294
57	0.023	0.145
60	0.020	0.120
74	0.048	0.191

¹ = Protocolo 1, ² = Protocolo 2

Aunque la edad del tejido del que se extrae el DNA no afecta el rendimiento del mismo (Q.F.B. Eva Huerta del LGMA del CIMMYT, comunicación personal), los resultados obtenidos demuestran lo contrario. En un ensayo previo se extrajo DNA de tejido joven (rebrotos de sorgo de 3 semanas) por el método del CTAB (Protocolo 1), se obtuvieron concentraciones mayores a las obtenidas con tejido maduro (Cuadro 10) pero menores a las reportadas en el Cuadro 9, para el tejido de la misma edad. Esto fue uno de los motivos por lo que se buscó otro método de extracción. El tamaño de la partícula del tejido del que se extrae el DNA juega un papel importante, la ventaja

adicional del liofilizado y molido del tejido es que puede conservarse a temperatura ambiente en recipientes o bolsas herméticamente cerrados.

Cuadro 10. Concentraciones de DNA de algunas familias ($\mu\text{g}/\mu$) obtenidas con edades diferentes del tejido vegetal. Método modificado del CTAB (Protocolo 1).

Muestra	Concentración de tejido maduro	Concentración de tejido joven
36	0.127	0.254
57	0.023	0.071
60	0.020	0.032

4.1.2 RFLP

Originalmente se había contemplado el etiquetado de sondas por medio del método de "nick translation" o "random priming", por lo que se probó el aislamiento del plásmido por minipreps, su digestión con enzimas de restricción y la separación del inserto en columnas de sefarosa; sin embargo, estos pasos provocaron la pérdida de una gran cantidad del mismo. Los métodos antes mencionados requieren de tiempo, grandes cantidades de DNA por reacción y reactivos adicionales, debido a esto se optó por el etiquetado de sondas por PCR.

En el etiquetado de las sondas por PCR con digoxigenina-dUTP, tanto la concentración de 2.5% como la de 5% produjeron resultados similares. En ambos casos la intensidad de las bandas se visualiza claramente, por lo que se utilizó la concentración de 2.5% para etiquetar a las sondas utilizadas para la hibridación de la población segregante (Figura 6).

Existen dos aspectos importantes en la obtención de autoradiografías: tipo de membrana (con o sin carga) y tipo de película plástica utilizada para cubrir las membranas durante la autoradiografía. Aunque los laboratorios proveedores de

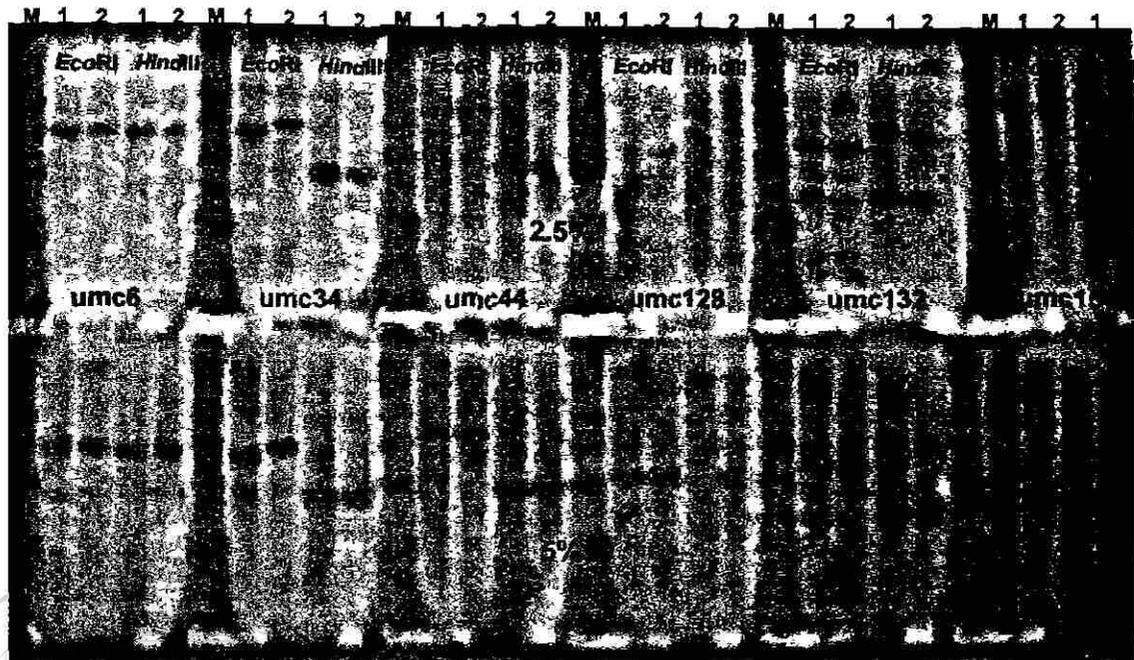


Figura 6. Autoradiografía de membranas de los progenitores, cada cinco carriles es una membrana hibridada con diferente sonda, el primer carril de cada una corresponde al marcador de peso molecular λ -HindIII etiquetado con digoxigenina-dUTP. Los carriles 1 corresponden a 22830, los carriles 2 corresponden a SJ7. El DNA fue digerido con *EcoRI* y *HindIII*. La concentración de las sondas fue de 2.5 y 5% de digoxigenina-dUTP.

membranas recomiendan el uso de la membrana con carga (Hybond +) para la obtención de RFLP debido a la nitidez de los resultados, en este estudio se observó lo

contrario; las autoradiografías de las membranas con carga provocaron interferencia (background = oscurecimiento) lo que dificultó la visualización y análisis de las bandas.

Este problema se solucionó cuando se cambió a membrana sin carga. En la transferencia del DNA ó Southern blotting se utilizó membrana de nylon sin carga (Biodyne A), ya que como se mencionó antes, disminuye la interferencia en las autoradiografías, facilitando la interpretación de los resultados.

En el caso de las películas plásticas, el grosor, color y elasticidad de estas juega un papel importante en la nitidez de las bandas; la película delgada, transparente, sin color y de menor elasticidad (Reynolds), produjo mejor calidad y nitidez en la visualización de las bandas que la película más gruesa, ligeramente

azulada y de mayor elasticidad (Kleen Pack); por lo que la primera se utilizó para cubrir las membranas que contenían el DNA de la población.

Inicialmente se probaron 71 sondas con los progenitores, de éstas, 23 detectaron polimorfismo cuando el DNA de las familias se corto con la enzima *EcoRI*, 17 con *HindIII*, siete con *BamHI*, seis con *DraI* y cinco con *EcoRV*. Con base a estos resultados se decidió utilizar las dos primeras enzimas para digerir el DNA de la población. Con el fin de aumentar el número de polimorfismos, se probaron 21 sondas adicionales detectando uno y tres polimorfismos para *EcoRI* y *HindI*, respectivamente. Del total de 92 sondas probadas, el 26% (24) y el 22% (20) mostraron polimorfismo cuando el DNA genómico fue digerido con *EcoRI* y *HindIII*, respectivamente. En el Cuadro 11 se anotan las sondas probadas con los progenitores y enzimas de restricción con las que se detectaron polimorfismos.

En el Cuadro 12 se observa el resumen de las sondas polimórficas con las cinco enzimas de restricción. Las sondas en negritas son las que se utilizaron para la hibridación de las membranas de la población. Las sondas con superíndice 1 son las que detectaron dos polimorfismos, en ningún caso se detectaron más de dos. Las sondas que no se utilizaron para la hibridación de las membranas de la población, son candidatas a utilizarse una vez que se regenere la población segregante. Las sondas que no se probaron con las enzimas de restricción *BamHI*, *DraI* y *EcoRV*, son candidatas también a probarse con los progenitores con el fin de detectar polimorfismos nuevos. Se observa también el grupo de ligamiento en sorgo en que han sido asignados en los mapas reportados en el Cuadro 8.

Cuadro 11. Sondas utilizadas para la selección con los progenitores. El tamaño de banda y número de cromosoma corresponden a maíz.

Nombre	Tamaño (bp)	Crom	EcoRI	HindIII	BamHI	DraI	EcoRV
asg8	500	7	m	m	m	m	m
asg34	1350	7	m	m	m	m	m
asg45	350	1	m	m	m	p	m
asg48	1600	3	m	m	m	m	p
asg62	500	1	p	m	m	m	m
bnl4.36	2300	5	m	m	m	m	m
bnl5.24	2500	5	m	m	m	m	m
bnl5.37	2300	3	m	m	m	m	m
bnl5.62	2100	1	m	m	x	x	x
bnl6.16	2450	3	m	p	m	m	m
bnl6.32	2250	1	m	m	m	m	m
bnl7.08	2300	8	p	p	m	m	m
bnl7.49	2100	10	p	p	m	m	m
bnl8.33	2500	5	m	m	x	x	x
bnl8.45	2100	2	p	m	m	m	m
csu16			p	m	-	-	-
csu25	1100	3	m	m	p	p	p
csu29	700	2	m	p	m	m	m
csu31	800	8	m	m	m	m	m
csu32	500	3	p	p	m	m	m
csu54	1400	9	m	m	m	m	m
csu61	500	9	m	m	m	m	m
csu64	400	2	p	m	m	m	m
csu86	*		m	p	m	m	m
csu93	800	5	p	p	m	m	m
csu109	900	2	p	m	m	m	m
csu147	800	9	p	m	m	m	m
csu164	700	1	m	p	m	m	m
npi209	*	9	m	p	x	x	x
npi220	400	8	p	m	m	m	m
npi285	970	10	m	m	m	m	m
npi386	1200	4	m	m	m	m	m
npi409	660	5	p	m	m	m	m
npi414	870	8	m	p	m	m	m
php20075	1400	10	m	m	m	m	p
php20581	1400	2	-	-	-	-	-
php20608	1500	4	m	m	m	m	m
php4239	1050	2	m	m	x	x	x
umc5	850	2	p	p	p	p	p
umc6	590	2	m	m	m	m	m
umc7	820	8	m	m	x	x	x
umc17	850	3	m	m	p	m	m
umc21	1050	6	p	m	m	m	m
umc27	890	5	m	m	x	x	x
umc28	1160	6	m	m	x	x	x
umc31	550	4	m	m	m	m	m
umc32	990	3	m	m	p	m	m
umc34	970	2	p	m	m	m	m

continuación...

Nombre	Tamaño (bp)	Crom	EcoRI	HindIII	BamHI	DraI	EcoRV
umc35	650	7	m	m	x	x	x
umc38	1010	6	p	p	m	m	m
umc44	800	10	m	m	m	m	m
umc49	630	2	m	m	p	m	m
umc52	780	4	-	-	-	-	-
umc53	640	2	m	p	m	m	m
umc58	920	1	m	m	x	x	x
umc59	930	6	m	m	m	m	m
umc61	1280	2	m	m	x	x	x
umc63	620	3	p	p	m	m	m
umc64	710	10	p	p	m	m	m
umc65	650	6	m	m	m	m	m
umc66	1020	4	m	m	p	m	m
umc67	650	1	m	m	m	p	m
umc76	760	1	m	p	m	m	m
umc85	600	6	p	p	m	m	m
umc87	550	4	m	m	x	x	x
umc90	1240	5	m	m	m	m	m
umc95	680	9	m	m	m	p	m
umc102	1010	3	m	m	m	m	m
umc103	730	8	m	m	x	x	x
umc105	610	9	m	m	x	x	x
umc107	1090	1	p	p	m	m	m
umc108	970	5	p	m	m	m	m
umc109	840	9	m	m	m	m	m
umc120	900	8	-	-	x	x	x
umc123	580	4	m	m	x	x	x
umc124	1160	8	m	p	m	m	m
umc126	670	5	m	m	m	m	m
umc127	1210	4	m	m	m	p	m
umc128	740	1	m	m	m	m	p
umc130	640	10	m	m	m	m	m
umc131	810	2	m	m	m	m	m
umc132	500	6	m	m	m	m	m
umc133	720	4	-	-	x	x	x
umc135	850	2	m	m	x	x	x
umc150	620	2	m	m	x	x	x
umc152	710	10	m	m	x	x	x
umc156	570	4	m	m	m	m	m
umc157	1220	1	p	m	p	m	m
umc161	700	1	p	m	m	m	m
umc163	410	10	-	-	x	x	x
umc168	1080	7	p	p	m	m	m
umc169	670	4	m	m	m	m	m

bp = pares de bases, p = polimórfica, m = monomórfica, x = no probada, - = no definida, * = tamaño no reportado

Cuadro 12. Resumen de las sondas que detectaron polimorfismos. El grupo de ligamiento se refiere a su localización en sorgo.

Nombre	Grupo de ligamiento	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>BamHI</i>	<i>DraI</i>	<i>EcoRV</i>
asg45					p	
asg48						p
asg62		p				
bnl6.16	G ⁴ :		p			
bnl7.08		p	p			
bnl7.49	E ⁺ , H ⁴	p	p			
bnl8.45 ¹		p				
csu16	G ⁺ (a), E ⁺ (b)	p	-	-	-	-
csu25	I ⁺			p	p	p
csu29			p			
csu32		p	p			
csu64		p				
csu86			p			
csu93		p	p			
csu109		p				
csu147		p				
csu164			p			
npi209	C ^{4,σ}		p	x	x	x
npi220	I ⁴	p				
npi409		p				
npi414			p			
php20075						p
umc5 ¹	B ^{6,ν}	p	p	p	p	p
umc17	A ^{3-μ} , F ^ν , C ^ν			p		
umc21	J ⁺	p				
umc32	F ⁺ , M ^ψ , A ⁶ , G ⁻			p		
umc34	E ^{ν,λ}	p				
umc38		p	p			
umc49	G ⁺			p		
umc53	II, D ^{ψ,μ}		p			
umc63	F ^ν , G ⁻	p	p			
umc64 ¹	I ^{ν,+} , E ^{4,σ}	p	p			
umc66				p		
umc67					p	
umc76	I, C ⁺ , E ^ψ , F ^μ		p			
umc85	A ⁴ , E ^ν	p	p			
umc95	A ^ν				p	
umc107	I, K ^ψ , H ^μ	p	p			
umc108	H ⁺	p				
umc124	F ⁺ , G ⁶ (a), E ⁶ (b)		p			
umc127	H ⁺				p	
umc128	B ⁺ , A ^ν					p
umc157	A ^ν	p		p		
umc161	A ^ν	p				
umc168	D ⁺ , B ^ν	p	p			

p = polimórfica, x = no probada, - = no definida. Cada símbolo corresponde a un mapa del Cuadro 8.

Debido a la disponibilidad limitada de DNA genómico de la población, se construyeron sólo cinco membranas con *EcoRI* y tres con *HindIII*, de éstas, solamente quedaron tres de *EcoRI* y dos de *HindIII*; las demás membranas se consumieron durante el proceso de ajuste de las condiciones de hibridación. Cada membrana se utilizó en un máximo de cuatro hibridaciones, después de estas la señal fue prácticamente nula.

4.1.3 SSR

En el Cuadro 13 se encuentran los nombres y las secuencias de los iniciadores utilizados para la generación de los microsatélites, se puede apreciar los tamaños de las bandas producidos con los progenitores; los tamaños de bandas producidos están dentro del rango reportado por Taramino *et al.* (1997). De los 13 pares de iniciadores probados, nueve produjeron polimorfismo y cuatro resultaron monomórficos. La temperatura de alineación a la que se produjeron los polimorfismos con cada uno de los pares de iniciadores se reporta en el Cuadro 13. Cabe mencionar que Taramino *et al.* (1997) reportaron 54°C como temperatura de alineación para todos los iniciadores.

El número de repeticiones del ciclo central del programa térmico que mejor definición de polimorfismos (bandas más brillantes y definidas) produjo fue de 35. De los 13 pares de iniciadores utilizados, los siguientes se han localizado en el genoma de sorgo: SbAGA01 (grupo de ligamiento = g.l. 8), SbAGB02 (g.l. 1), SbAGB03 (g.l. 6), SbAGE03 (g.l. 5), SbAGF06 (g.l. 1), SbAGH04 (g.l. 6) y SbKAFGK1 (g.l. 10) (Taramino *et al.*, 1997).

Cuadro 13. Iniciadores utilizados en la generación de SSR, las secuencias de cada par, temperatura de alineación y rango del tamaño de las bandas producido en cada progenitor.

Iniciadores	Secuencia	Temperatura de alineación	Banda (bp) 22830/SJ7
SbAGA01	CGAACCATGATAAATGACTG ATCCGTTTCACAAAAAAGT	52°C	165/172
SbAGE01	GACCGATCTAATGATGCAG ACGGTAGAGAAGACCCATC	*	-
SbAGB02	CTCTGATATGTCGTTGTGCT ATAGAGAGGATAGCTTATAGCTCA	52°C	297/329
SbAGD02	AGCACTGCTTGACACTCC CTTTGAAACCCTGAACTCAT	42°C	180/313
SbAGG02	ATCCATGCATATATCCGAC TTCGTCACCCACAACATAC	*	-
SbAGB03	GTGTGTGTAGCTTCTTGGG ACGTAGGAGTAGTTTCTAGGATT	45°C	547/98
SbAGE03	AGCTCTCAGCCTTTCACAAT GGAAGAAAGGAATGACTTGA	52°C	63/70
SbAGF06	GTAAACGACCAATCACCC TAGAGGTGTCAGTATGAGC	*	-
SbAGF08	ATGGTCGTCTGTCCAGGT CAGTTGCTAATCTTTGACCG	*	-
SbAGH04	GGCACTCATGGAGTCACA TTTATCCAAATCAAACCGG	50°C	170/200
SvPEPCAA	GCAGCTCAGGGACAAATAC CTGCTTCAGGTAAGGATCG	52°C	a) 215/230, b) 88/198
SvHPRGPG	ACTCCGACGCACCCTAAG CTCCATTCTTGTAGCACGTA	52°C	262/255
SbKAFGK1	AGCATCTTACAACAACCAAT CTAGTGCAGTGAAGTATGAC	52°C	130/150

* monomórficos con todas las temperaturas

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.2 Mapa de ligamiento genético

Cuando se inició este trabajo no se disponía de plantas F_2 , por lo que se establecieron familias F_3 para el desarrollo del trabajo. Las plantas F_2 permiten distinguir el genotipo de cada planta (por ejemplo AA, Aa, aa), por lo que, lo ideal es el aislamiento del DNA de estas familias y la evaluación fenotípica en las familias F_3 (la evaluación de F_2 son difíciles de llevar a cabo debido a la baja disponibilidad de

semilla). El aislamiento de DNA de las plantas F_2 nos permite determinar en forma exacta el origen de la banda del alelo marcador.

Cuando se utilizan familias F_3 , durante el muestreo de las plantas descendientes de la F_2 segregante (Aa), se tiene en sí una mezcla de plantas de diferentes segregaciones (esto es porque se siembra la familia por surco y se colecta el tejido de plantas al azar dentro del surco, o sea plantas heterocigotas y homocigotas), por lo que no es posible determinar el origen de las bandas en caso de que sea heterocigote (no es posible determinar si se deba sólo a plantas Aa o a una combinación de AA con aa o de todos los genotipos a la vez) disminuyéndose por lo tanto la potencia del análisis.

En el Cuadro 14 se observan los valores χ^2 obtenidos de los rangos de segregación de los marcadores moleculares. Se tomaron como base los rangos de segregación esperados para poblaciones F_2 en marcadores codominantes (Cuadro 2). Debido a que las membranas no se construyeron con el mismo número de familias (por lo poca disponibilidad del DNA), los valores esperados difieren. Los valores obtenidos son más altos que los valores de tabla ($\alpha = 0.01$ y 0.05) por lo que se presenta segregación distorsionada de los marcadores.

La construcción de mapas de ligamiento y localización de QTL se basa en la suposición de que los marcadores moleculares y caracteres de interés, segregan de acuerdo a las frecuencias mendelianas. La segregación distorsionada ha sido documentada en un amplio rango de organismos incluyendo a las plantas; además, se han encontrado numerosos ejemplos de frecuencias alélicas inesperadas de marcadores moleculares. En plantas, la segregación distorsionada puede deberse a causas genéticas, fisiológicas y/o ambientales y se puede manifestar como transmisión diferencial en líneas germinales machos y hembras, resultado de la selección postcigótica antes de la selección genotípica. Puede deberse también a selección

gametofítica masculina o, a la habilidad competitiva diferencial del polen genéticamente variable (Xu, 1997).

Cuadro 14. Valores χ^2 de la segregación de los marcadores moleculares. Los valores χ^2 de tabla para $\alpha = 0.01, 0.05$ y 0.10 con dos grados de libertad son $0.02, 0.10$ y 0.21 , respectivamente.

Locus marcador	Valores observados	Valores esperados	Valor χ^2
SbAGA01	12:6:30	12:24:12	40.5
SbAGB02	13:19:16	12:24:12	2.45
SbAGB03	7:28:13	12:24:12	4.82
SbAGD02	6:13:21	10:20:10	16.15
SbAGE03	10:31:7	12:48:12	8.43
SbAGH04	10:4:27	10.25:20.5:10.25	40.65
SvPEPCAAa	11:10:26	11.75:23.5:11.75	25.07
SvPEPCAAb	16:1:28	11.25:22.5:11.25	22.91
SvHPRGPG	24:4:17	11.25:22.5:11.25	32.64
SbKAFGK1	8:31:9	12:24:12	4.12
csu16	12:20:13	11.25:22.5:11.25	0.372
npi220	15:5:20	10:20:10	23.75
umc5a	13:18:14	11.25:22.5:11.25	3.32
umc5b	16:5:24	11.25:22.5:11.25	30.09
umc21	13:16:12	10.25:20.5:10.25	2.02
umc34	26:5:11	10.5:21:10.5	24.01
umc53	17:9:10	9:18:9	11.72
umc64a	14:3:7	6:12:6	17.57
umc64b	14:3:7	6:12:6	17.57
umc157	9:17:18	11:22:11	5.94

Además de las causas antes mencionadas, es común que la segregación distorsionada pueda deberse a la falta de clasificación correcta de los alelos marcadores debido a genotipos ambiguos o a errores durante la lectura y captura de los datos. En algunos casos las autoradiografías son difíciles de leer, por ejemplo, cuando presentan interferencia o oscurecimiento del fondo, o bien, las bandas son demasiado débiles y pueden perderse (Kearsey and Pooni, 1996).

Con los datos de segregación de los RFLP y SSR se construyó una matriz de datos de acuerdo a las especificaciones del programa MapMaker. La matriz se formó con los datos de segregación de 20 marcadores moleculares (10 RFLP y 10 SSR) en 63 familias. El marcador SvPEPCAA (SSR) definió dos polimorfismos especificados

como SvPEPCAAa y SvPEPCAAAb en la matriz de datos. Los marcadores RFLP correspondieron a: csu16, npi220, umc 5, umc21, umc34, umc53, umc64, umc157. Los marcadores umc5 y umc64 definieron dos polimorfismos especificados en la matriz de datos como umc5a y umc5b para el primero y, umc64a y umc64b para el segundo.

De acuerdo a Staub *et al.* (1996) un LOD >3.0 se considera un nivel apropiado para determinar ligamiento entre dos loci. El hecho de que un grupo de ligamiento sea detectado a un LOD de 3.0, significa que la hipótesis de ligamiento es 1000 veces más probable que la hipótesis de no ligamiento; obviamente, al reducir el LOD a 2.0 se reduce la probabilidad de ligamiento a 100 veces más. Para la construcción del mapa de ligamiento se utilizaron LOD de 2.0 y 3.0. Un grupo de ligamiento de 17.0 cM se formó con los marcadores SvPEPCAAa y SvPEPCAAAb con un LOD de 3.0. Cuando se redujo el LOD a 2.0, se formaron dos grupos de ligamiento, uno de los cuales fue el mismo formado a un LOD de 2.0; el otro grupo de ligamiento se formó con los marcadores umc53 y umc 157, la longitud fue de 40.3 cM (Figura 7).

De los 20 marcadores analizados, sólo cuatro quedaron integrados en dos grupos de ligamiento. El tamaño de población en este caso jugó un papel importante.

Cuando el tamaño de población es pequeño, gran cantidad de marcadores quedan sin ligar; a medida que el tamaño de población se incrementa, el número de marcadores ligados se incrementa también. En forma empírica, Binelli *et al.* (1992) demostraron lo anterior; con 40 individuos formaron un grupo de ligamiento de tres marcadores, al incrementar el tamaño de la población a 80, el mismo grupo de ligamiento se incrementó a cinco marcadores, con 149 individuos, el grupo de ligamiento se conformó de seis marcadores. El tamaño reducido de población pudo compensarse incrementando el número de marcadores moleculares. Por ejemplo, Chittenden *et al.* (1994) construyeron su mapa de ligamiento con sólo 52 familias, pero 375 marcadores.

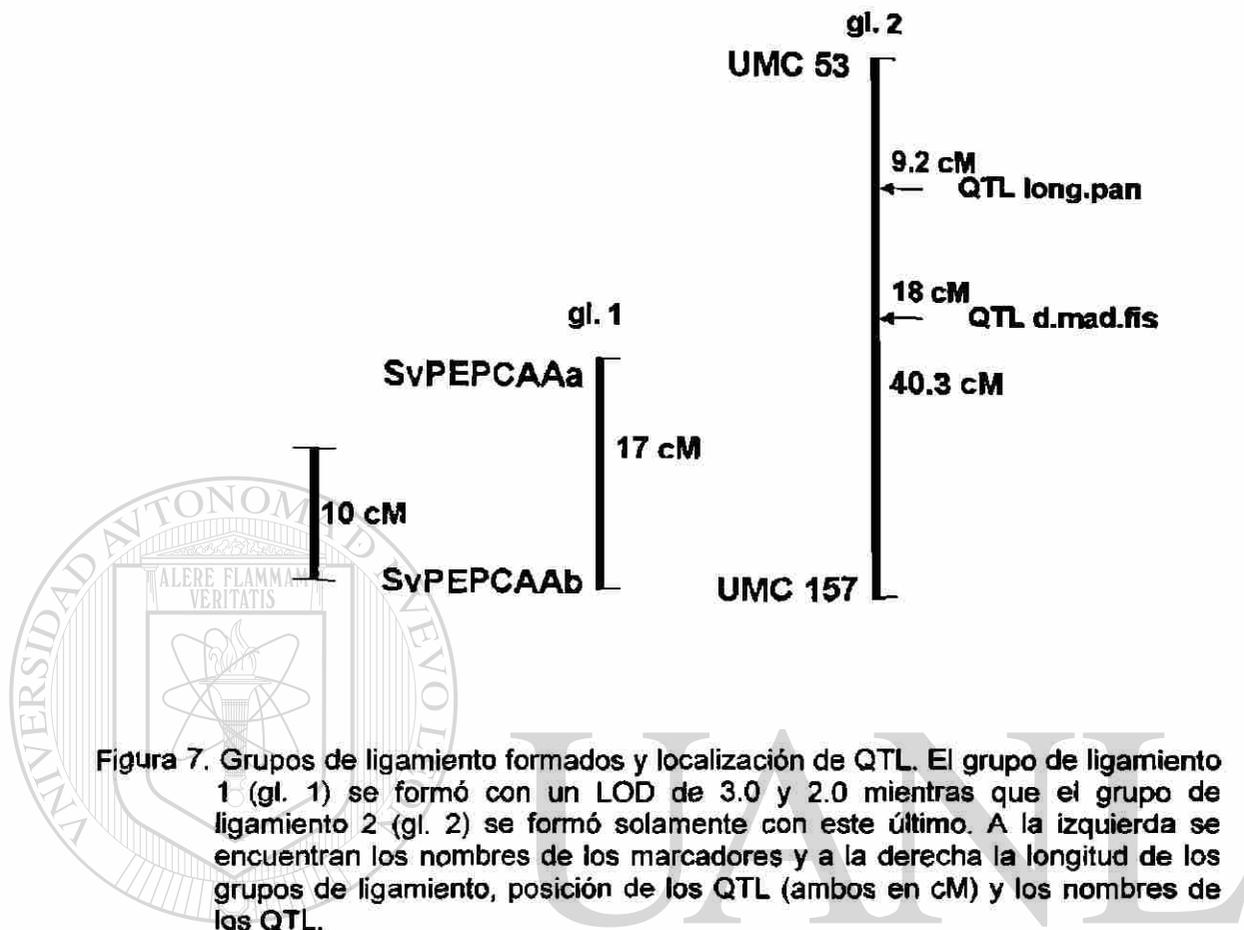


Figura 7. Grupos de ligamiento formados y localización de QTL. El grupo de ligamiento 1 (gl. 1) se formó con un LOD de 3.0 y 2.0 mientras que el grupo de ligamiento 2 (gl. 2) se formó solamente con este último. A la izquierda se encuentran los nombres de los marcadores y a la derecha la longitud de los grupos de ligamiento, posición de los QTL (ambos en cM) y los nombres de los QTL.

En el caso de que el objetivo principal sea la localización de QTL, el tamaño de la población se debe incrementar, de esta forma se incrementa la precisión en la localización de los QTL y en la identificación de QTL con efectos pequeños. El tamaño de población requerida está en función del umbral (T) a exceder (si el QTL está presente) y del LOD esperado (ELOD) y, puede determinarse mediante la ecuación $T/ELOD$.

A medida que se reduce el LOD en la formación del mapa de ligamiento, el número de marcadores ligados aumenta, incrementándose el número de grupos de ligamiento. Sin embargo, simultáneamente se aumenta la probabilidad de detectar falsos ligamientos. Si el LOD continúa disminuyéndose, los grupos de ligamiento

independientes se unen formando un solo grupo de ligamiento con todos los marcadores. Cuando se realizó la construcción del mapa de ligamiento con LOD de 1, se formaron cuatro grupos de ligamiento con un promedio de 3.5 marcadores por grupo. El LOD recomendado para la construcción de mapas de ligamiento es de 3.0 (Staub *et al.*, 1996).

La utilidad de un mapa de ligamiento genético depende del grado de saturación (número de marcadores y espaciamiento) y de la precisión para estimar las distancias entre los marcadores. Mediante la fórmula: $n = \log(1-P) / \log(1-2c/k)$, Beckmann and Soller (1986) determinaron que se necesitan 41 marcadores espaciados cada 10 cM para cubrir el 50% de un genoma de tamaño 1000 cM; para cubrir el 80, 90 y 95% del mismo genoma se necesitan 96, 137 y 178 marcadores, respectivamente. Si esta fórmula se aplica al genoma del sorgo, y tomando como longitud del genoma la reportada por Peng *et al.* (1999) de 1347 cM, se necesitan 200 marcadores espaciados cada 10 cM para cubrir el 90% del genoma; suponiendo que los 20 marcadores reportados en este trabajo se encuentran en igual espaciamiento (cosa que no sucede), entonces se está cubriendo sólo el 9% de la longitud total del genoma de *Sorghum bicolor*.

Los marcadores que resultaron ligados no han sido reportados en trabajos anteriores. En el caso de los marcadores SvPEPCAAa y SvPEPCAAb, los cuales son SSR, el único reporte que se encontró corresponde a Taramino *et al.* (1999), quienes utilizaron como referencia a la secuencia de los iniciadores; sin embargo, estos autores reportaron sólo un polimorfismo. En este trabajo se detectaron dos polimorfismos con estos iniciadores, los cuales se encuentran ligados con una distancia de 17 cM. Los microsatélites son secuencias tandem que se encuentran repetidas cada 2-5 bp; además, diferentes alelos pueden ser detectados en un locus utilizando los iniciadores, lo que significa que los alelos se encuentran ligados.

De los marcadores SSR reportados como ligados por Taramino *et al.* (1999), ninguno corresponde al reportado aquí. El marcador umc53 se reporta sin ligar por Dufour *et al.* (1996). Hulbert *et al.* (1990) lo reportaron ligado al grupo de ligamiento 2, mientras que Melake-Berhan *et al.* (1993) lo reportaron en el grupo de ligamiento D. El marcador umc157 se reporta dentro del grupo de ligamiento A del mapa de Peng *et al.* (1999). En los mapas de sorgo revisados (Cuadro 8), no existe reporte de ligamiento entre los marcadores antes mencionados debido a que no se han manejado en forma conjunta.

Aunque el espaciamiento óptimo entre marcadores para localizar QTL se ha reportado entre 10 y 20 cM, Darvasi and Soller (1994) encontraron que para iniciar estudios de localización de QTL puede incrementarse este espaciamiento a 50 cM; para este caso, el número de marcadores necesarios para cubrir el 90% del genoma de sorgo se disminuye a 39. En el caso del grupo de ligamiento 1, la distancia entre marcadores (17 cM) queda entre los valores óptimos; la distancia entre los marcadores en el grupo de ligamiento 2 es muy cercana a la reportada por Darvasi and Soller (1994).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.3 Análisis de QTL

Para el ciclo O-I 1997 se analizaron los datos fenotípicos de 50 familias con las variables: AP, Exc, LP y DF. En el ciclo P-V 1998 se analizaron 63 familias con las variables: AP, Exc, LP, DF, DMF y RP.

Con el método de localización por intervalo (MapMaker/QTL), solamente se detectaron QTL en el ciclo P-V 1998. En el Cuadro 15 se presentan los QTL identificados para las variables LP y DMF. Es importante señalar que ambos QTL se encuentran en el grupo de ligamiento 2, su posición se observa en la Figura 7. En el

caso del QTL para LP, este se presentó con un valor LOD de 2.30, explicando sólo el 36.5% de la varianza del carácter. El QTL para DMF explicó el 87.1% de la varianza del carácter y se presentó con un valor LOD de 10.10.

Cuadro 15. QTL identificados en la población de familias F_2 (SJ7 X 22830). El LOD utilizado en la identificación de los QTL fue de 2.0 para la longitud de panoja y 4.0 para días a madurez fisiológica.

Grupo de ligamiento	Variable	Valor LOD	Varianza exp.
umc53-umc157	Long.panoja	2.30	36.5%
umc53-umc157	D.madurez	10.10	87.1%

De acuerdo con Lander y Botstein (1989), un LOD entre 2.0 y 3.0 en el caso de identificación de QTL, asegura una probabilidad del 5% de un falso positivo, aunque está en función del tamaño del genoma y densidad de RFLP.

El valor LOD de 2 es un valor bajo en el caso del sorgo, de acuerdo a los cálculos de Lander y Botstein (1989), el sorgo necesitaría un valor de 2.25 si los marcadores se encontraran espaciados cada 20 cM; en la localización de QTL, el valor del umbral a exceder (ELOD) está en función del tamaño del genoma, número de cromosomas y espaciamiento entre marcadores. Un valor de 2.4 ($\alpha = 0.001$) se

requiere para el tomate que tiene 12 cromosomas, un genoma de 1100 cM y un espaciamiento entre marcadores de 20 cM. El valor de 4 utilizado en DMF, implica que es 10,000 más probable la localización del QTL que la no localización ($\alpha = 0.0001$), aunque lo relevante es el valor del umbral LOD, el cual debe ser mayor de 4.

En las Figuras 8 y 9 se encuentran las probabilidades de los QTL identificados a lo largo del grupo de ligamiento, la región que sobrepasa la línea del umbral LOD, indica la presencia del QTL. En el eje horizontal se presenta la distancia en cM entre los marcadores umc53-umc157; puede observarse que los picos de las curvas de los QTL corresponden a la localización de éstos dentro del grupo de ligamiento 2 (Figura 7). La presencia del QTL de LP se corrobora en el análisis de marcadores individuales.

El QTL de DMF no se corroboró con este método; sin embargo, su localización esta validada por el valor LOD con el que se identificó (10.10).

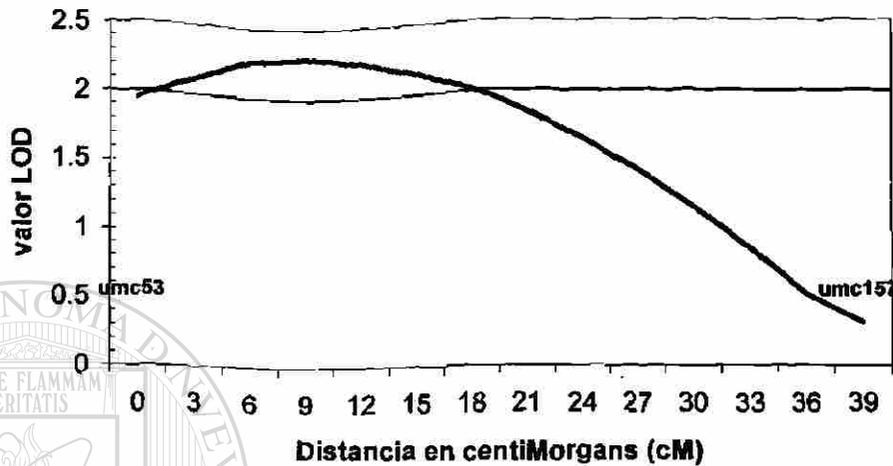


Figura 8. Gráfica de LOD QTL para la longitud de panoja La distancia en cM corresponde a la distancia entre los marcadores umc53-umc157 del grupo de ligamiento 2. El umbral del LOD es 2.0.

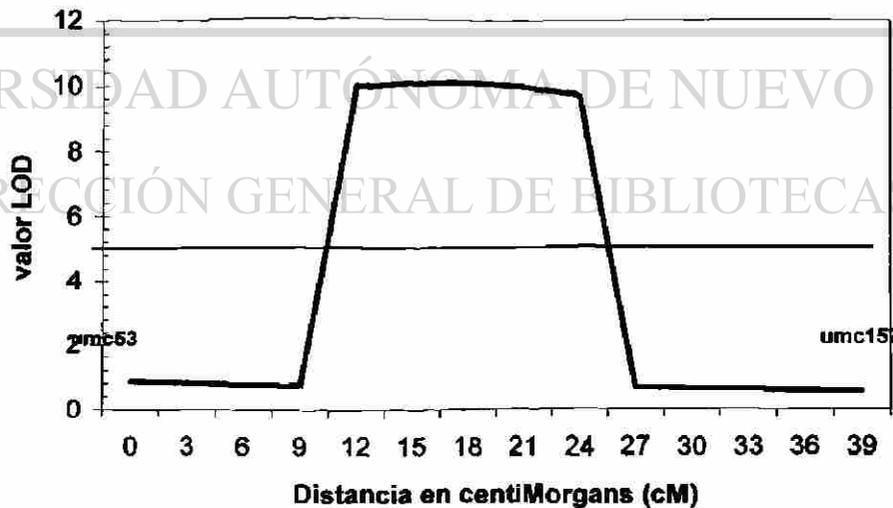


Figura 9. Gráfica de LOD QTL para los días a madurez fisiológica. La distancia en cM corresponde a la distancia entre los marcadores umc53-umc157 del grupo de ligamiento 2. El umbral del LOD es 4.0.

El análisis de marcadores individuales se realizó con umc53 y umc157 resultando significativo para la variable LP (Cuadro 16), corroborando el QTL detectado por análisis de localización por intervalo. En maíz, los marcadores umc53 y umc157 están ligados a QTL para número de hileras y longitud de mazorca, respectivamente (Veldboom and Lee, 1996). En el análisis de marcadores individuales, cuando el marcador está ligado al QTL de una variable determinada, el resultado es significativo. Sin embargo, no se determina su posición probable y se confunde el efecto del QTL con la frecuencia de recombinación entre éste y el marcador. En el análisis de localización por intervalo, se prueba la hipótesis de presencia del QTL cada determinada distancia (por ejemplo cada 1 cM) en un intervalo entre dos marcadores.

El resumen de los QTL identificados por el análisis de marcadores individuales ($\alpha = 0.05$) se observa en el Cuadro 16, puede observarse que varios marcadores están ligados a QTL y algunos se repiten en ambos ciclos. Para el caso de los marcadores umc53 y umc157, fueron significativos solamente para el QTL de LP igual que con el análisis de localización por intervalo (marcados con asterisco). Cuando el análisis de marcadores individuales se realizó con probabilidad $\alpha = 0.01$, solamente se

conservaron los QTL para AP en el ciclo O-I 1997, detectado por el marcador SbAGH04 y, para RP en el ciclo P-V 1998, detectado por los marcadores SbAGE03, npi220 y umc5a (Cuadro 16). Conforme se disminuye la probabilidad (α) de error tipo I, el análisis de marcadores individuales se hace más estricto permaneciendo sólo los QTL con mayor significancia. Los valores de probabilidad utilizados frecuentemente en la construcción de mapas de ligamiento y localización de QTL son: $\alpha = 0.05$, $\alpha = 0.01$ y $\alpha = 0.001$.

Cuadro 16. QTL identificados por análisis de marcador individual con un nivel $\alpha = 0.05$. Los QTL y marcadores con negritas son los que se conservan cuando el análisis se realizó con $\alpha = 0.01$.

Marcador	Variable	Ciclo
SbAGH04	Altura de planta	O-I 97
umc 64b	Altura de planta	O-I 97
umc 21	Altura de planta	O-I 97
csu 16	Longitud de panoja	O-I 97
umc157*	Longitud de panoja	O-I 97
SbAGA01	Altura de planta	P-V 98
umc 34	Altura de planta	P-V 98
umc 5a	Altura de planta	P-V 98
csu 16	Longitud de panoja	P-V 98
umc 53*	Longitud de panoja	P-V 98
SbAGB02	Días a floración	P-V 98
umc 21	Días a floración	P-V 98
npi 220	Días a mad. fisio.	P-V 98
SbAGE03	Rendimiento/planta	P-V 98
npi 220	Rendimiento/planta	P-V 98
umc 5a	Rendimiento/planta	P-V 98

* = detectados en localización por intervalo

Como se observa en el Cuadro 16, el marcador umc34 está ligado al QTL para AP en el ciclo P-V 1998, esto mismo fue reportado en maíz por Veldboom y Lee (1996). En el mismo cuadro, varios marcadores están ligados a QTL para un mismo carácter. Lo anterior es debido a que los marcadores se encuentran ligados dentro del mismo grupo de ligamiento en la región del QTL, o bien que varios QTL son responsables del carácter y se encuentran distribuidos a lo largo del genoma en grupos de ligamiento diferentes (hay que recordar que los caracteres cuantitativos son el efecto combinado de genes mayores y poligenes).

El QTL de LP detectado por csu16, es el único que se repite en los dos ciclos agrícolas. A excepción del QTL anterior, los demás no se repiten. Cuando se evalúa una población en ambientes diferentes, los QTL de un ambiente no necesariamente son los mismos del otro ambiente. La expresión fenotípica de los caracteres cuantitativos es afectada por los factores del ambiente (condiciones de suelo, temperatura, humedad, longitud del día) y puede modificar en gran proporción la

expresión del carácter. Cuando la expresión fenotípica es medida en ambientes diferentes, permite maximizar las diferencias del carácter y por consiguiente localizar los QTL responsables de la expresión del mismo.

En maíz, la evaluación de poblaciones en ambientes diferentes para la localización de QTL, es el método ideal para localizar genes de respuesta a condiciones de estrés; además permite el entendimiento de algunos tipos de interacción genotipo X ambiente. La identificación de QTL consistentes a través de ambientes diferentes es deseable en programas de selección asistida por marcadores (Veldboom and Lee, 1996 b). Bajo este criterio, el QTL de LP detectado por csu16 es recomendable para incluirse dentro de un programa de selección.

Cuando el mismo marcador se encuentra asociado a varios caracteres, significa que las variables están correlacionadas y puede deberse a los efectos pleiotrópicos de genes simples de ligamiento estrecho entre genes que afectan al mismo carácter. Los marcadores asociados a dos caracteres fueron: umc21 asociado con AP y DF, umc5a asociado a AP y RP; y np1220 asociado a DMF y RP; En la mayoría de las Poaceae, un incremento de la AP está correlacionado con los DF. En sorgo específicamente, dos de

los tres QTL que afectan los DF están asociados con los QTL de AP (Xu, 1997), esto explica los QTL de AP y DF detectados por umc21. No existen reportes de SSR ligados a QTL de componentes del rendimiento que sean útiles para corroborar los resultados obtenidos.

4.3.1 Datos fenotípicos

En el Cuadro 17 se encuentran los cuadrados medios, las fuentes de variación y la significancia de las variables evaluadas en los dos ciclos, las tablas de los análisis de varianza se encuentran en el Apéndice. Para el caso del ciclo O-I 1997, debido a la

pérdida de los bloques dos y tres, se analizaron 54 familias para las variables AP, Exc y LP; En el caso de los DF se analizó la información de 25 familias.

En el ciclo P-V 1998 se evaluaron 66 familias para las variables AP, Exc, LP, DF y DMF; para la variable RP se evaluaron 65 familias. Debido a la naturaleza de la investigación, solamente se presentan los resultados de las variables con significancia en las familias dentro de bloques.

Cuadro 17. Cuadrados medios y significancias de las fuentes de variación de las variables medidas en los ciclos Otoño-Invierno 1997 y Primavera-Verano 1998.

Variables	F.V.		
	Bloques	Rep(blo)	Fam(blo)
Altura de planta 97	322.3481**	55.8924NS	325.9243**
Excursión 97	51.3346**	5.2814NS	31.6578**
Longitud de panoja 97	6.0094NS	6.9979NS	14.9485NS
Días a floración 97	7.9886**	1.7333NS	3.7313*
Altura de planta 98	1400.7174**	369.1727**	229.7009**
Excursión 98	151.5149**	63.3671NS	46.2788NS
Longitud de panoja 98	84.9000**	23.8810**	17.3418**
Días a floración 98	8.7822*	10.1918*	5.8813**
Días a madurez fisiológica 98	6.1946NS	20.0892*	9.1039NS
Rendimiento por planta 98	1187.0011**	455.8994NS	247.2704NS

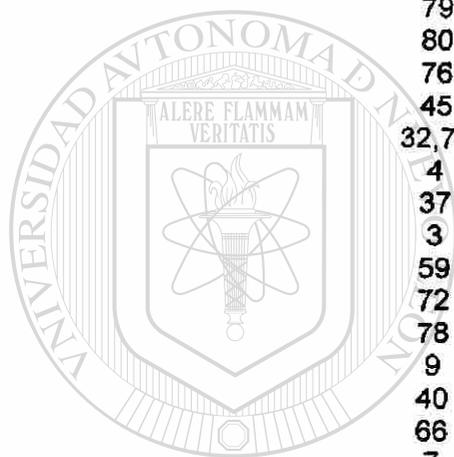
4.3.1.1 Altura de planta

Como puede observarse en el Cuadro 17, la AP presentó diferencias altamente significativas en ambos ciclos. Durante el ciclo P-V 1998 la AP fue menor a la altura del ciclo O-I 1998. La altura en el ciclo O-I 1997 presentó un rango de 62.20 a 135 cm mientras que el rango del ciclo P-V fue de 42 a 113 cm. La comparación de medias para la AP de las familias dentro de bloques en el ciclo O-I 1997 se encuentra en el Cuadro 18, la familia con mayor altura fue la 70 con una media de 135 cm aunque estadísticamente fue igual a las familias 48, 77 y 60 con 117.35 cm, 115.95 cm y 114.35 cm, respectivamente. La familia con menor altura fue la 39 con 62.20 cm, la cual es estadísticamente similar a otras 11 familias. En la Figura 10 se observa el

comportamiento de la variable. El comportamiento ideal para las variables cuantitativas en la localización de QTL es el de una distribución normal. La variable correlacionada con AP en el ciclo O-I 1997 fue Exc ($r = 0.469$, $\alpha = 0.01$).

Cuadro 18 Comparación de medias de las familias dentro de bloques para la variable altura de planta en el ciclo Otoño-Invierno 1997.

Fam	Altura (cm)	
70	135.00	A
48	117.35	AB
77	115.95	ABC
60	114.35	ABCD
75	113.30	BCDE
79	110.95	BCDEF
80	110.45	BCDEFG
76	109.60	BCDEFGH
45	107.35	BCDEFGH
32,74	106.50	BCDEFGH
4	105.40	BCDEFGHI
37	105.10	BCDEFGHI
3	104.70	BCDEFGHIJ
59	104.55	BCDEFGHIJ
72	104.35	BCDEFGHIJ
78	104.00	BCDEFGHIJ
9	102.55	BCDEFGHIJK
40	102.50	BCDEFGHIJK
66	102.45	BCDEFGHIJK
7	100.45	BCDEFGHIJKL
61	100.15	BCDEFGHIJKL
54,57	99.65	BCDEFGHIJKLM
56	99.25	BCDEFGHIJKLM
33	98.50	BCDEFGHIJKLM
1	98.30	BCDEFGHIJKLM
35	97.00	BCDEFGHIJKLM
47	96.10	BCDEFGHIJKLMN
52	95.65	BCDEFGHIJKLMN
38	94.45	CDEFGHIJKLMN
49	93.10	DEFGHIJKLMN
44	93.05	DEFGHIJKLMN
43	91.40	EFGHIJKLMN
10	90.80	EFGHIJKLMN
63	90.40	FGHIJKLMN
36	89.70	FGHIJKLMNÑ
64	89.20	FGHIJKLMNÑ
58	88.90	FGHIJKLMNÑ
2	88.55	FGHIJKLMNÑ
71	88.40	GHIJKLMNÑ
46	88.15	GHIJKLMNÑ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

continuación...

67	88.10	GHIJKLMNÑ
5	87.25	HIJKLMNÑ
8	83.65	IJKLMNÑO
50	83.60	IJKLMNÑO
34	82.50	JKLMNÑO
73	82.40	JKLMNÑO
53	82.30	JKLMNÑO
55	80.95	KLMNÑO
31	79.60	LMNÑO
51	79.10	LMNÑO
42	77.15	MNÑO
68	73.60	NÑO
62	67.55	ÑO
39	62.20	O

Medias estadísticamente iguales tiene la misma letra.

La comparación de medias de las familias dentro de bloques del ciclo P-V 1998 se encuentra en el Cuadro 19, la familia con mayor altura correspondió a la 73 con 113.9, cm aunque estadísticamente fue igual a las familias 27, 77, 24, 76, 71, 78, 60, 79, 61 y 66. La familia que presentó menor altura fue la seis con 42 cm. Durante los dos ciclos, las familias 77 y 60 tuvieron un comportamiento estadísticamente igual a la familia con mayor altura (familias 70 y 73 en O-I 1997 y P-V 1998, respectivamente), la familia 79 tuvo también un comportamiento superior en ambos ciclos aunque sólo durante P-V 98 fue estadísticamente superior.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

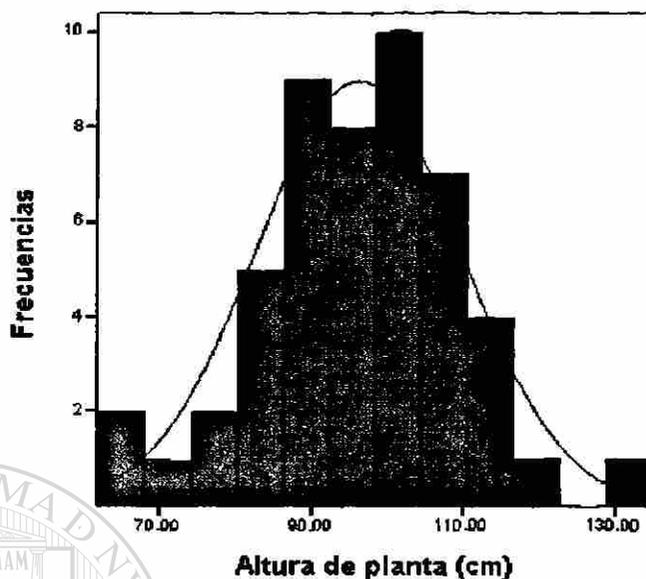


Figura 10. Distribución de frecuencias para la variable altura de planta en el ciclo O-I 1997. Los valores de la media y la mediana son de 94.85 y 96.55 cm, respectivamente.

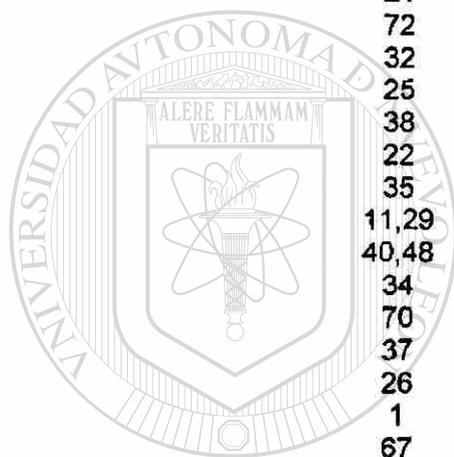
En la Figura 11 se observa el histograma de frecuencias correspondiente; la variable presenta un comportamiento menos semejante a la distribución normal que en

el primer ciclo de evaluación. Las variables correlacionadas con AP en el ciclo P-V 1998 fueron, Exc, LP y RP ($r = 0.539, 0.703$ y 0.643 , respectivamente, $\alpha = 0.01$).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cuadro 19. Comparación de medias de las familias dentro de bloques para la variable altura de planta en el ciclo Primavera-Verano 98.

Fam	Altura (cm)	
73	113.90	A
27	104.50	AB
77	102.60	ABC
24,76	97.90	ABCD
71	97.13	ABCDE
78	95.70	ABCDEF
60	95.50	ABCDEF
79	95.40	ABCDEF
61	95.20	ABCDEF
66	94.00	ABCDEFGF
23	93.90	BCDEFG
58	93.00	BCDEFGH
21	92.40	BCDEFGHI
72	92.30	BCDEFGHI
32	91.40	BCDEFGHI
25	91.30	BCDEFGHI
38	88.90	BCDEFGHIJ
22	88.80	BCDEFGHIJ
35	87.50	BCDEFGHIJK
11,29	86.70	BCDEFGHIJK
40,48	86.10	BCDEFGHIJKL
34	84.40	BCDEFGHIJKLM
70	83.60	CDEFGHIJKLMN
37	83.20	CDEFGHIJKLMN
26	82.90	CDEFGHIJKLMNÑ
1	81.70	DEFGHIJKLMNÑO
67	81.40	DEFGHIJKLMNÑO
7	80.30	DEFGHIJKLMNÑOP
15	79.70	DEFGHIJKLMNÑOP
36	78.50	DEFGHIJKLMNÑOP
80	78.40	DEFGHIJKLMNÑOP
74	77.90	DEFGHIJKLMNÑOPQ
4	76.80	EFGHIJKLMNÑOPQ
53	76.60	FGHIJKLMNÑOPQ
62	76.40	FGHIJKLMNÑOPQ
68	74.50	GHIJKLMNÑOPQ
47	74.40	GHIJKLMNÑOPQ
19	74.30	GHIJKLMNÑOPQ
20	73.76	GHIJKLMNÑOPQ
30,33	73.50	HIJKLMNÑOPQ
31,75	72.80	HIJKLMNÑOPQ
9	72.60	IJKLMNÑOPQ
10	70.80	JKLMNÑOPQ
28	70.20	JKLMNÑOPQ
51	69.70	JKLMNÑOPQ
3,17	68.10	KLMNÑOPQ
52	67.30	KLMNÑOPQ



UNL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

continuación...

8	66.20	LMNÑOPQR
4	65.70	MNÑOPQRS
41	65.56	MNÑOPQRS
42	64.30	MNÑOPQRS
43	63.90	NÑOPQRS
54	63.80	NÑOPQRS
46	63.00	NÑOPQRS
45	62.60	ÑOPQRS
39	62.20	OPQRS
49	62.10	OPQRST
63	61.40	OPQRST
5,57	61.00	PQRST
2	60.30	PQRST
55	60.05	PQRST
56	57.60	QRST
59	46.40	RST
64	46.00	ST
50	42.50	T
6	42.00	T

Medias estadísticamente iguales tiene la misma letra.

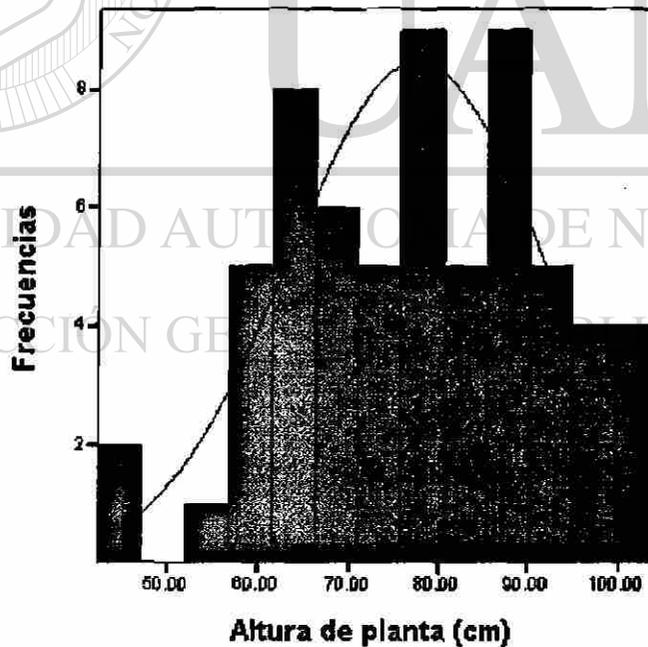


Figura 11. Distribución de frecuencias para la variable altura de planta en el ciclo Primavera-Verano 1998. Los valores de la media y la mediana son de 75.93 y 77.60 cm, respectivamente.

4.3.1.2 Excursión

La Exc en algunas familias del ciclo O-I 1997, presentó un comportamiento similar a la AP, es decir, familias cuyo comportamiento fue superior para ambos caracteres (familias 45, 32, 48, 4, 77, 75, 79). Este comportamiento se explica por el coeficiente de correlación significativo entre las dos variables ($r = 0.469$). La comparación de medias de las familias dentro de bloques se encuentra en el Cuadro 20, la mayor Exc se presenta en la familia 45, aunque estadísticamente fue igual a las familias 40, 32, 48, 4, 49, 38, 77, 75, 79, 5 y 55. La Exc se presentó con rango de 1.6 a 19.20 cm en la población. En la Figura 12 se observa el comportamiento de la variable con respecto a la curva de distribución normal.

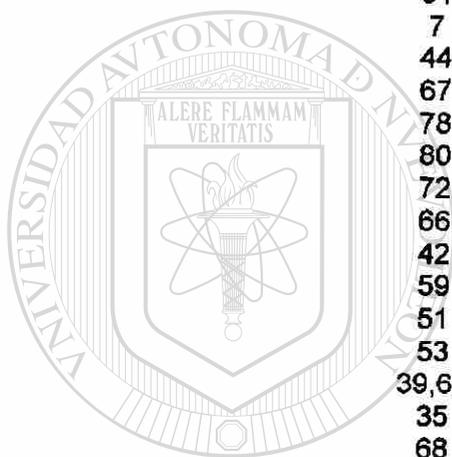
Cuadro 20. Comparación de medias de las familias dentro de bloques para la variable excursión en el ciclo Otoño-Invierno 1997.

Fam	Excursión de la hoja bandera (cm)	
45	19.20	A
40	16.00	AB
32	15.45	ABC
48	15.05	ABCD
4	14.95	ABCD
49	14.90	ABCD
38	14.50	ABCDE
77	14.30	ABCDEF
75	14.15	ABCDEF
79	13.80	ABCDEFG
5	13.00	ABCDEFGH
55	12.45	ABCDEFGHI
9,64	11.95	BCDEFGHIJ
47	11.90	BCDEFGHIJ
3	11.80	BCDEFGHIJ
60	11.40	BCDEFGHIJ
76	11.30	BCDEFGHIJ
1	10.80	BCDEFGHIJK
33	10.75	BCDEFGHIJK
2	10.65	BCDEFGHIJK
71	10.20	BCDEFGHIJKL
46	10.15	BCDEFGHIJKL
34,61	9.90	BCDEFGHIJKL
63	9.85	BCDEFGHIJKL

continuación...

50	9.70	BCDEFGHIJKLM
43	9.60	BCDEFGHIJKLM
70	9.05	BCDEFGHIJKLMN
54	8.90	BCDEFGHIJKLMN
10	8.75	CDEFGHIJKLMNÑ
36	8.50	CDEFGHIJKLMNÑ
74	8.40	CDEFGHIJKLMNÑ
8	8.25	CDEFGHIJKLMNÑ
37	8.15	DEFGHIJKLMNÑ
52	7.70	EFGHIJKLMNÑ
57	7.40	EFGHIJKLMNÑ
58	7.25	FGHIJKLMNÑ
56	7.20	FGHIJKLMNÑ
73	6.80	GHIJKLMNÑ
31	6.55	HIJKLMNÑ
7	6.45	HIJKLMNÑ
44	5.85	HIJKLMNÑ
67	5.75	IJKLMNÑ
78	5.60	IJKLMNÑ
80	5.20	JKLMNÑ
72	5.00	JKLMNÑ
66	4.10	KLMNÑ
42	3.90	KLMNÑ
59	3.50	LMNÑ
51	3.25	LMNÑ
53	2.65	MNÑ
39,62	2.35	NÑ
35	1.70	Ñ
68	1.60	Ñ

Medias estadísticamente iguales tiene la misma letra.



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

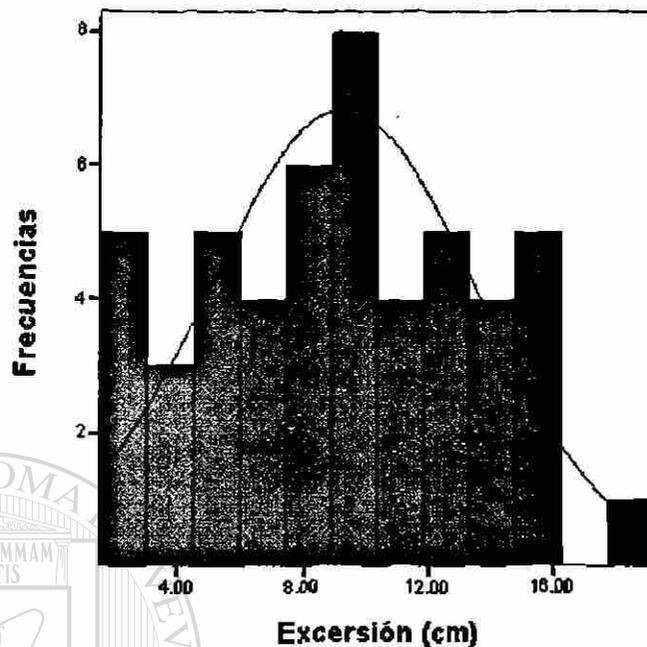


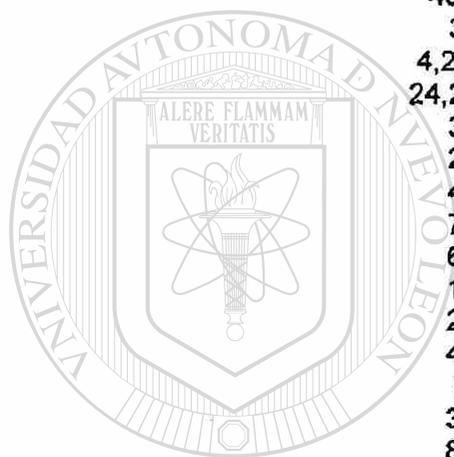
Figura 12. Distribución de frecuencias para la variable excersión en el ciclo Otoño-Invierno 1997. Los valores de la media y la mediana son de 7.97 y 9.32 cm, respectivamente.

4.3.1.3 Longitud de panoja

La LP fue significativa solamente durante el ciclo P-V 1998. El rango de esta variable en la población fue de 11.29 a 33.80 cm. La comparación de medias de las familias dentro de bloques se encuentra en el Cuadro 21, la familia con mayor LP fue la 79 con 33.8 cm, la cual fue estadísticamente igual a las familias 38, 63, 58, 73, 61, 66, 32, 34, 77, 71, 42, 74, 78, 1, 21, 70, 40 y 67. Las familias estadísticamente superiores comunes con AP para este mismo ciclo fueron: 79, 73, 61, 66, 77, 71 y 78. El coeficiente de correlación entre ambas variables fue significativo ($r = 0.703$). El comportamiento de la población con respecto a una distribución normal de observa en la Figura 13.

Cuadro 21. Comparación de medias de las familias dentro de bloques para la variable longitud de panoja en el ciclo Primavera-Verano 1998.

Fam	Longitud de panoja (cm)	
79	33.80	A
38,63	31.00	AB
58,73	30.90	AB
61	29.80	ABC
66	28.80	ABCD
32	28.30	ABCDE
34	28.20	ABCDE
77	27.60	ABCDEF
71	27.56	ABCDEF
42,74,78	27.10	ABCDEFG
1,21	27.00	ABCDEFG
70	26.90	ABCDEFG
40,67	26.60	ABCDEFG
35	26.50	BCDEFG
4,25,75	26.40	BCDEFG
24,26,72	26.10	BCDEFGH
37	25.90	BCDEFGHI
22	25.60	BCDEFGHI
48	25.50	BCDEFGHI
76	25.40	BCDEFGHI
68	25.20	BCDEFGHIJ
11	25.10	BCDEFGHIJ
29	24.80	BCDEFGHIJK
44	24.70	BCDEFGHIJK
7	24.30	BCDEFGHIJK
30	24.10	BCDEFGHIJK
80	24.00	BCDEFGHIJK
31,51	23.90	BCDEFGHIJK
20	23.86	BCDEFGHIJK
15	23.80	BCDEFGHIJK
19,33	23.60	CDEFGHIJK
60	23.50	CDEFGHIJK
39	23.00	CDEFGHIJK
47	22.80	CDEFGHIJK
17,23	22.60	CDEFGHIJK
62	22.40	DEFGHIJK
27	22.20	DEFGHIJK
8	21.90	DEFGHIJK
9	21.70	DEFGHIJK
45	21.50	EFGHIJK
56	21.40	EFGHIJK
28,53	21.30	EFGHIJK
2	21.27	EFGHIJK
38	21.20	EFGHIJK
43,52	21.10	EFGHIJK
49	20.80	FGHIJK
41	20.50	FGHIJK
10	20.30	GHIJK



NL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

continuación...		
3	19.90	GHIJK
64	19.00	HIJK
46	18.80	IJK
55	18.62	IJK
54	18.10	JKL
5,50	18.00	JKL
59	17.80	KL
57	17.70	KL
6	11.25	L

Medias estadísticamente iguales tiene la misma letra.

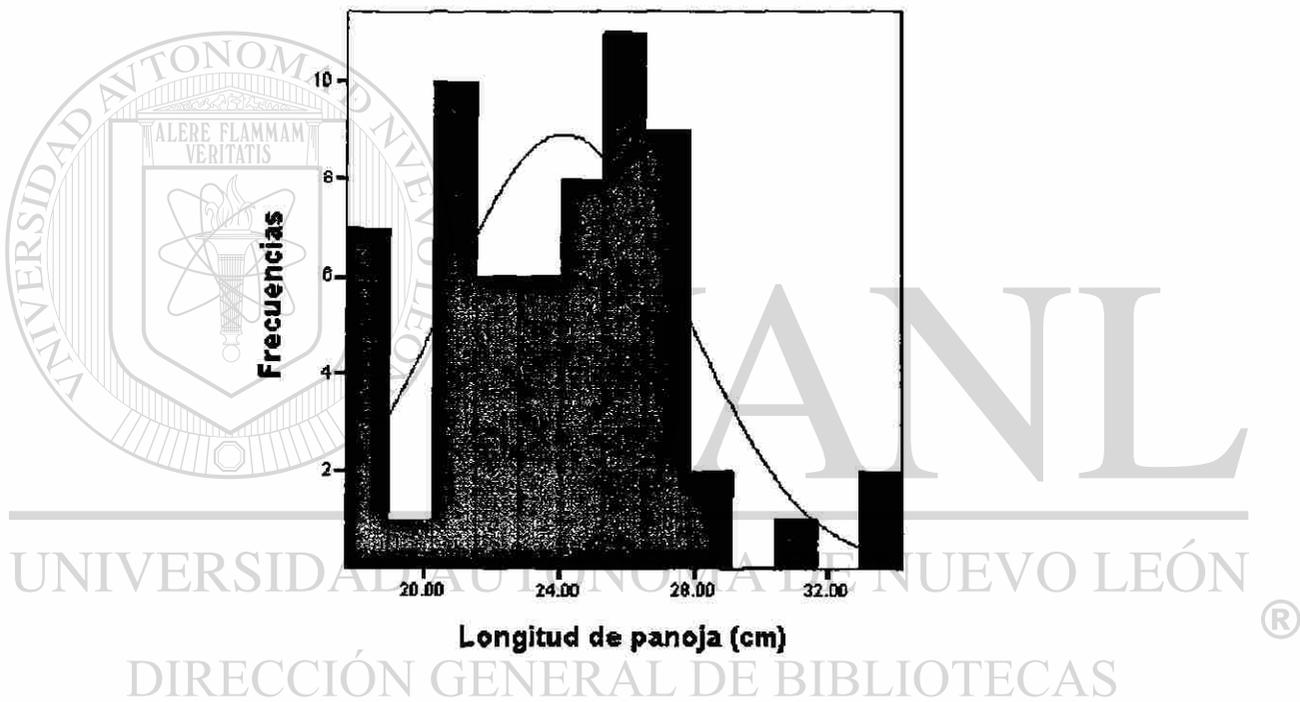


Figura 13. Distribución de frecuencias para la variable longitud de panoja en el ciclo Primavera-Verano 1998. Los valores de la media y la mediana son de 23.70 y 24.10 cm, respectivamente.

4.3.1.4 Días a floración

En el ciclo O-I 1997, los DF presentaron diferencias significativas para las familias dentro de bloques (Cuadro 17). El rango de los DF de las familias dentro de

bloques fue de 58 a 63.5 días. En la comparación de medias de las familias en el Cuadro 22 puede observarse que la familia 33 presentó el mayor número de DF (63.5 días) siendo estadísticamente igual a las familias 3, 10, 34, 37, 45, 51, 75, 40, 31, 32, 36, 38, 64 y 4. Las familias más precoces tuvieron 58 DF y fueron: 46, 53, 57, 60, 63, 66 y 76 aunque estadísticamente fueron iguales a las familias con 59, 59.5 y 60 días. Esta variable no mostró correlación con otras variables. Como se observa en la Figura 14, el comportamiento de la variable en la población no sigue una distribución normal. Esta variable no mostró correlación con ninguna otra variable.

Cuadro 22. Comparación de medias de las familias dentro de bloques para la variable días a floración en el ciclo Otoño-Invierno 1997.

Fam	Días a floración
33	63.5 A
3,10,34,37,45,51,75	63.0 AB
40	62.5 AB
31,32,36,38,64	62.0 ABC
4	61.5 ABC
62,68,77	61.0 BC
2,50,56,67,79	60.0 BCDE
9	59.5 CDE
52,54,74	59.0 DE
46,53,57,60,63,66,76	58.0 E

Medias estadísticamente iguales tiene la misma letra.

En el ciclo P-V 1998, los DF fueron altamente significativos para las familias dentro de bloques (Cuadro 17). En las familias dentro de bloques (Cuadro 23), 54 de las 73 familias fueron estadísticamente iguales con un rango de 60 a 64 días. El rango que presentó la población fue de 50.5 a 64 días. Esta variable no mostró correlación con las demás variables. En la Figura 15 se observa que al igual que en el ciclo O-I 1997, el comportamiento de la variable no mostró normalidad.

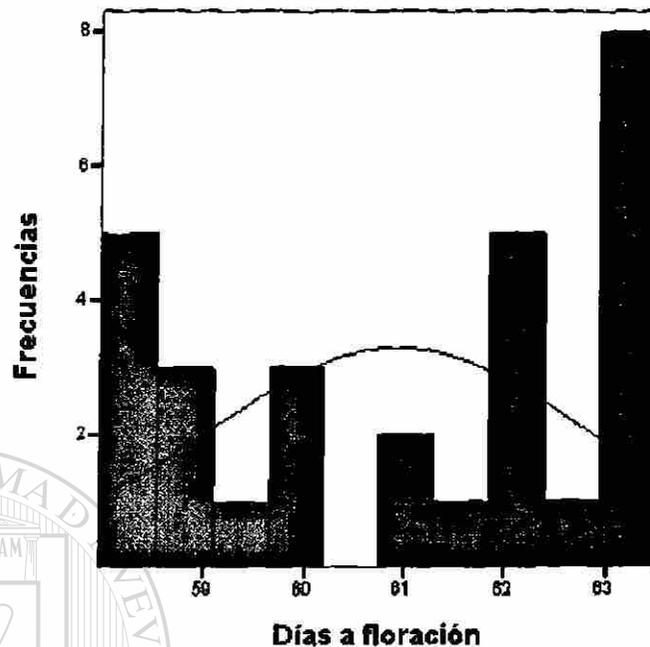


Figura 14. Distribución de frecuencias para la días a floración en el ciclo Otoño-Invierno 1997. Los valores de la media y la mediana son de 60.72 y 61 días, respectivamente.

Cuadro 23. Comparación de medias de las familias dentro de bloques para la variable días a floración dentro del ciclo Primavera-Verano 98.

Fam	D.flor
5,8,20,55	64.0 A
35,37,39	63.5 AB
6,62,63,64	63.0 ABC
2,25,26,42,43,58,60	62.5 ABCD
15,38,47,50,74	62.0 ABCD
22,31,44,45,49,52,66,68,70	61.5 ABCD
11,21,51,56,57,79	61.0 ABCDE
1,3,7,10,23,24,33,40,71,78	60.5 ABCDE
4,9,17,19,29,36	60.0 ABCDE
41,46,67	59.5 BCDE
32,34,80	59.0 CDE
30,48	58.5 DE
72,73,76,77	58.0 DE
53,54,59,61,75	57.0 E
27,28	50.5 F

Medias estadísticamente iguales tiene la misma letra.

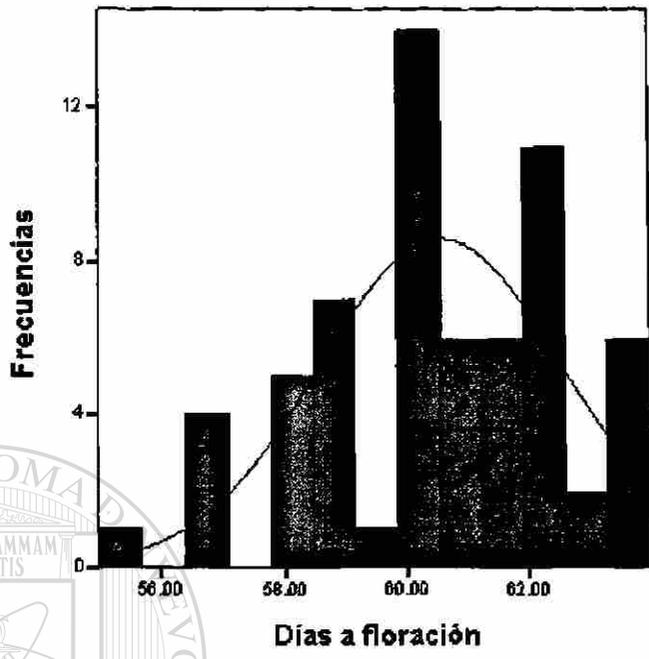
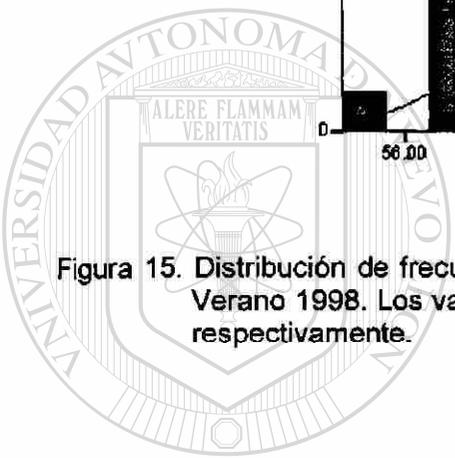


Figura 15. Distribución de frecuencias para los días a floración en el ciclo Primavera-Verano 1998. Los valores de la media y la mediana son de 60.68 y 61 días, respectivamente.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La mejor edad del tejido vegetal para la extracción de DNA es cuando la planta es joven (aproximadamente 3 semanas).
 - Se obtiene mayor concentración de DNA con el método de extracción de Saghai-Maroo *et al.* (1984) modificado por Hoisington *et al.* (1994) (Protocolo 2) que con el método modificado de Doyle and Doyle (1988) (Protocolo 1).
 - En el etiquetado de sondas de maíz para hibridación con sorgo, debe utilizarse 2.5% de digoxigenina-dUTP ya que produce bandas de la misma intensidad que las etiquetadas al 5%. Además de que se reduce el costo de la digoxigenina-dUTP en un 50%.
 - En la transferencia de ácidos nucleicos (Southern) y generación de autoradiografías, debe utilizarse membrana sin carga (Biodyne A) y película plástica de la marca Reynolds, debido a que no producen interferencia (background) en las autoradiografías
-
- Las sondas de maíz detectan bajo porcentaje de polimorfismo en sorgo.
 - Las sondas de maíz umc5 y umc64, detectaron dos polimorfismos cada una para la población derivada de la cruce SJ7X 22830.
 - Para obtener resultados confiables (bandas definidas y claras) en la autoradiografías, debe utilizarse 10 µg de DNA por muestra en cada membrana; además cada membrana debe utilizarse hasta cuatro veces como máximo.
 - Con base en el punto anterior y en la cantidad de sondas a seleccionar, es importante calcular la cantidad de DNA requerido por muestra durante el desarrollo del trabajo.

- Los iniciadores reportados en el Cuadro13 producen polimorfismos SSR para poblaciones derivadas de la cruz SJ7 X 22830.
 - El par de iniciadores SvPEPCAA, detectan dos polimorfismos para poblaciones derivadas de la cruz SJ7X 22830.
 - La distorsión de la segregación de los marcadores moleculares se debió en parte a la falta de clasificación correcta de las bandas de las autoradiografías originadas por: diferente número de familias en las membranas, cantidades menores a 10 µg de DNA por familias en algunas membranas, problemas en la hibridación y fallas durante el revelado.
 - El tamaño pequeño de la población originó que la mayoría de los marcadores quedaran sin agrupar.
 - Los marcadores umc53 y umc157 se encuentran ligados a una distancia de 40.3 cM con un LOD de 2.
 - Los marcadores SvPEPCAAa y SvPEPCAAb, se encuentran ligados a una distancia de 17 cM con un LOD de 3.
-
- A medida que se disminuye el LOD en la construcción de mapas de ligamiento genético, se incrementa el número de grupos de ligamiento.
 - Los marcadores reportados en este trabajo cubren aproximadamente el 9% de la longitud total del genoma del sorgo. Se necesitan 200 marcadores (espaciados cada 10 cM) para cubrir el 90% del genoma.
 - Los QTL localizados en una población evaluada en un ambiente determinado, no necesariamente son los mismos si la población se evalúa en otro ambiente.
 - En el intervalo entre los marcadores umc53-umc157, se localizan QTL para LP y DMF a una distancia de 9.2 y 18 cM del marcador umc53, respectivamente.

- El QTL de LP, es el responsable del 36.5% de la variación del carácter.
- El QTL de DMF, es el responsable del 87.1% de la variación del carácter.
- Los marcadores: SbAGH04, umc64b, umc21, SbAGA01, umc34 y umc5a; se encuentran ligados al QTL de AP.
- Los marcadores: csu16, umc157 y umc53; se encuentran ligados al QTL de LP.
- Los marcadores SbAGB02 y umc21, se encuentran ligados al QTL de DF.
- El marcador npi220, se encuentra ligado al QTL de DMF.

- Los marcadores SbAGE03, npi220 y umc5a; se encuentran ligados al QTL de RP.

- La consistencia del QTL de LP ligado al marcador csu16 en los dos ambientes de prueba, lo hacen candidato para incluirse dentro de un programa de selección asistida por marcadores.

- El marcador umc21 está ligado a los QTL de AP y DF.
- El marcador umc5a está ligado a los QTL de AP y RP. Esto fue corroborado por la significancia del coeficiente de correlación.

COMENTARIOS GENERALES

Este es sólo el primer trabajo acerca de la construcción de mapas de ligamiento y localización de QTL que se realiza en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León. En este informe se encuentra la información básica y las técnicas de laboratorio utilizadas para la generación de RFLP y SSR. Las técnicas de laboratorio pueden o no modificarse dependiendo del cultivo a manejar. Si se desea trabajar con sorgo, la metodología está ajustada a las condiciones del Laboratorio de Genética de la FAUANL.

Se cuenta con la información de las sondas de maíz que detectan polimorfismo en cualquier población originada de la cruce SJ7 X 22830. Debido a que el sorgo es un cultivo con bajo polimorfismo, es necesario incrementar el número de sondas ya sea de maíz o sorgo, mediante selección con los progenitores (22830 y SJ7). Se recomienda seleccionar de entre los iniciadores reportados por Brown *et al.* (1996) para la generación de marcadores SSR, aquellos que generen polimorfismos de utilidad en la población. Con el fin de construir un mapa de ligamiento lo más completo posible, es recomendable detectar cuando menos 200 polimorfismos y, aumentar el tamaño de población.

Con el fin de tener una fuente permanente de DNA y aumentar la precisión en la construcción del mapa de ligamiento y localización de QTL, es necesario generar líneas recombinantes a partir de los progenitores 22830 y SJ7. Si por alguna causa no se desea avanzar en la generación de la población, y se desean evaluar familias F_3 , se recomienda realizar el aislamiento de DNA de las plantas F_2 . En este caso lo conveniente es almacenar tejido ya sea congelado a -80°C o bien liofilizado y/o molido a 4°C .

Se recomienda darle seguimiento a los QTL localizados así como a los marcadores asociados a ellos y, dependiendo de los objetivos de mejoramiento, determinar su consistencia en ambientes diferentes para incorporarse dentro de programas de selección asistida por marcadores.

Por último, es necesario con base al tipo y número de marcadores moleculares a utilizar, a la técnica de etiquetado de sondas, a la vida útil de cada membrana y al número de hibridaciones por realizar; determinar la cantidad de DNA necesario por cada familia o línea (incluyendo F₁ y progenitores) agregando un porcentaje para el ajuste de la técnicas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



BIBLIOGRAFÍA

- Barrera S., H. 1992. Información genética. Su estructura, función y manipulación. Colección Ciencia básica. CONACYT. México p. 87
- Basten, C.J., Z-B Zeng and B.S. Weir. 1995. QTL Cartographer: a suite of programs for mapping quantitative trait loci. Plant Genome IV Conference. <http://www.intl-pag.org/pag/4/abstracts/c6.html>
- Beckmann, J.S. and M. Soller. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theor Appl Genet* 67:35-43
- Beckmann, J.S. and M. Soller. 1986. Restriction fragment length polymorphisms in plant genetic improvement. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*. 83:196-250
- Bennetzen, J.L. and A. Melake-Berhan. 1994. Generation of a genetic map for *Sorghum bicolor*. DNA-Based Markers in Plants. Eds. Phillips, R.L. and I.K. Vasik. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 291-298
- Binelli, G., L. Gianfranceschi, M.E. Pê, G. Taramino, C. Busso, J. Stenhouse and E. Ottaviano. 1992. Similarity of maize and sorghum genomes as revealed by maize RFLP probes. *Theor Appl Genet* 84:10-16
- Botstein D, R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 32:314-331
-
- Brown, T.A. 1990. Gene cloning. An introduction. Second edition. Chapman & Hall
- Brown, S.M., M.S. Hopkins, S.E. Mitchell, M.L. Senior, T.Y. Wang, R.R. Duncan, F. González-Candelas and S. Kresovich. 1996. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Theor Appl Genet* 93:190-198
- Burr, B. 1994. Some concepts and new methods for molecular mapping in plants. DNA-Based Markers in Plants. Eds. Phillips, R.L. and I.K. Vasik. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 1-7
- Burr, B., F.A. Burr, K.H. Thompson, M.C. Albertson and C.W. Stuber. 1988. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. *Genetics* 118:519-526
- Casas, A.M., A.J. Kononowicz, T.G. Hann, L. Zhang, D.T. Tomes, R.A. Biessan and P.M. Hasegava. 1997. Transgenic sorghum plants obtained after microprojectile bombardment of immature inflorescence. *In Vitro Cell. Der. Biol-Plant* 33:92-100
- Chittenden, L.M., K.F. Schertz, Y-P Lin, R.A Wing and A.H Paterson. 1994. A detailed RFLP map of *Sorghum bicolor* x *S. propinquum*, suitable for high-density

- mapping, suggest ancestral duplication of sorghum chromosomes or chromosomal segments. *Theor Appl Genet* 87:925-933
- CIMMYT, 1996. Molecular marker applications to plant breeding. A Workshop offered by the Applied Molecular Genetics Laboratory. CIMMYT. El Batán, México.
- Darvasi, A. and M. Soller. 1994. Optimum spacing of genetic markers for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci. *Theor Appl Genet* 89:351-357
- De Oliveira, A.C., T. Ritcher and J.L. Bennetzen. 1996. Regional and racial specificities in sorghum germoplasm assessed with DNA markers. *Genome* 39:579-587
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1988. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15
- Dufuor, P., L. Grivet, A. D'Hount, M. Deu, G. Trouche, J.C. Glaszmann and P. Hamon. 1996. Comparative genetic mapping between duplicated segments on maize chromosome 3 and 8 and homoeologous regions in sorghum and sugarcane. *Theor Appl Genet* 92:1024-1030
- Gardiner, J.N., H.E. Coe, S. Melia-Hancock, D. Hoisington and S. Chao. 1993. Development of a core RFLP map in maize using an immortalized F₂ population. *Genetics* 134:917-930
- Hoisington, D.M., M. Khairallah and D. González-de-León. 1994. Laboratory protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Third edition. México, D.F. CIMMYT.
- Hoelzel, A.R. and D.R. Bancroft. 1992. Statistical analysis of variation. In *Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach*. Ed. Hoelzel, A.R. IRL Press. Oxford University Press. pp. 297-306
- Hulbert, S.H., T.E. Ritcher, J.D. Axtell and J.L. Bennetzen. 1990. Genetic mapping and characterization of sorghum and related crops by means of maize DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:4251-4255
- IPGRI. 1996. Measuring genetic variation. <http://www.ipgri.cgiar.org>
- Jansen, R.C. 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135:205-211
- Jiang, Ch. and Z-B. Zeng. 1995. Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 140:1111-1127
- Knapp, S.J. 1991. Using molecular markers to map multiple quantitative trait loci: models for backcross, recombinant inbred, and doubled haploid progeny. *Theor Appl Genet* 81:333-338
- Karcher, S.J. 1995. Molecular cloning. A project approach. Academic Press.

Kearsey, M.J. and H.S. Pooni. 1996. The genetical analysis of quantitative traits. Chapman & Hall. London

Kochert, G. 1994. RFLP technology. DNA-Based Markers in Plants. Eds. Phillips, R.L. and I.K. Vasik. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 8-38

Koornneef, M. and P. Stam. 1992. Genetic analysis. Methods in Arabidopsis research. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.

Lander, E.S. 1992. MapMaker 3.0 user manual. Whitehead Institute. Cambridge, Massachusetts

Lander, E.S. and D. Botstein. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-199

Lewin, B. 1994. Genes V. Oxford University Press

Liscum M. and P. Oeller. AFLP: not only for fingerprinting, but for positional cloning. Department of Plant Biology. Carnegie Institution of Washington. Stanford, CA. <http://aflp.html.enplantbiology.stanford.edu>

Liu, B-H. 1998. Statistical genomics. Linkage, mapping and QTL analysis. CRC Press. Boca Ratón, Florida. USA. p. 611

Ludlow, M.M., J. Basnayake, M. Cooper, Y. Tao, R.G. Henzell, J.M. Manners, I.D. Godwin and S.M.C. Duncan. 1993. A physiological-genetic analysis of osmotic adjustment to water stress in grain sorghum. Use of Molecular Markers in Sorghum and Pearl Millet Breeding for Developing Countries. Eds. Witcombe, J.R. and R.R. Duncan. Overseas Development Administration. Norwich, U.K. pp. 17-22

Martínez, O. and R.N. Cumow. 1992. Estimating the locations and the sizes of the effects of quantitative trait loci using flanking markers. *Theor Appl Genet* 85:480-488

Melcher, U. 1997. AFLP's. Molecular genetics. p. 11128. <http://www.ipgri.cgiar.org>

Melake-Berhan, A., Hulbert, S.H., Butler, L.G. and J.L. Bennetzen. 1993. Structure and evolution of genomes of *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *Theor Appl Genet*. 86:598-604

Moreno, G. J. 2001. Marcadores moleculares en la mejora genética de plantas. Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo. La Coruña, España. <http://seg.umh.es/Docencia/lecciones/marcmol.html>

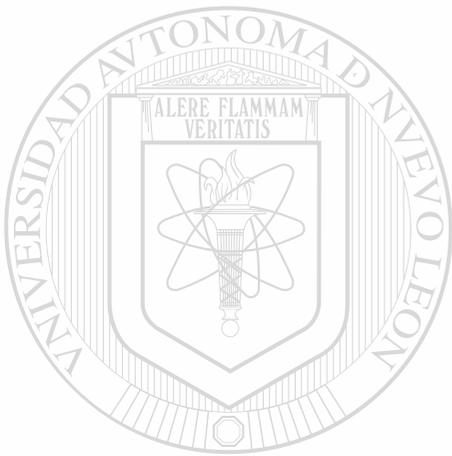
Narro, S, J., R. Velásquez-Valle, J.A. Quijano and R. Paredes. 1998. Ergot: new disease of sorghum in México. Proceedings for 1998. Conference on the status of sorghum ergot in northamerica. <http://www.sorghumgrowers.com/Research/confermc/narro/narro.html>

Nelson, J.C. 2000. QGene. <http://www.qgene.com/QGene.html>

- Pammi, S., K. Schertz, G. Xu., G. Hart and J.E. Mullet. 1994. Random-amplified polymorphic DNA markers in sorghum. *Theor Appl Genet* 89:80-88
- Peng, Y., K.F. Schertz, C. Cartinhour and G.E. Hart. 1999. Comparative genome mapping of *Sorghum bicolor* (L.) Moench using an RFLP map constructed in a population of recombinant inbred lines. *Plant Breeding* 118:225-235
- Pereira, M.G. and M. Lee. 1995. Identification of genomic regions affecting plant height in sorghum and maize. *Theor Appl Genet* 90:380-388
- Pereira, M.G., M. Lee., P. Bramel-Cor, W. Woodman, J. Dobley and R. Whitkus. 1994. Construction of an RFLP map in sorghum and comparative mapping in maize. *Genome* 37:236-243
- Perkin-Elmer Lab AFLP plant mapping kit. The PCR marker of choice for plant mapping. Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA
- Ragab, R.A., S. Dronavalli, M.A. Saghai-Marooof and Y.G. Yu. 1994. Construction of a sorghum RFLP linkage map using sorghum and maize probes. *Genome* 37:590-594
- Reiter, R.S., R.M. Young and P.A. Scolnik. 1992. Genetic linkage of the *Arabidopsis* genome: methods for mapping with recombinant inbreds and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Methods in Arabidopsis Research*. World Scientific Publishing Co. pp. 170-190
- Roswell Park Cancer Institute. 2000. Map manager QT. <http://www.mapmgr.roswellpark.org/mmQT.html>
- Salinas G., G.E. 1996. Mapping quantitative trait loci controlling agronomic traits in *Brassica napus* L. Doctor of philosophy thesis. Faculty of Science of the University of Birmingham
- Seetharama, N., C.W. Magill and F.R. Miller. 1993. Molecular markers for cold tolerance in sorghum. *Use of Molecular Markers in Sorghum and Pearl Millet Breeding for Developing Countries*. Eds. Witcombe, J.R. and R.R. Duncan. Overseas Development Administration. Norwich, U.K. pp. 32-34
- Soller, M. and J.S. Beckmann. 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theor Appl Genet* 67:25-33
- Stam, P. 1995. JoinMap 2.0 deals with all types of plant mapping populations. *Plant Genome III*. <http://probe.nalusda.gov:8000/otherdoes/pg/pg3/47pg3.html>
- Staub, J.E. 1994. *Crossover. Concepts and applications in genetics, evolution and breeding. An interactive computer-based laboratory manual*. The University of Wisconsin Press
- Staub, J.E., F.C. Serquen and M. Gupta. 1996. Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *HortScience* 31:729-741

- Stuber, Ch.W. 1989. Molecular markers in the manipulation of quantitative characters. Plant population genetics, breeding and genetic resources. Sinauer Associates Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. pp. 334-366
- Stuber, Ch.W. 1994. Breeding multigenic traits. In DNA-Based Markers in Plants. Eds. Phillips, R.L. and I.K. Vasik. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 97-115
- Tao, Y., J.M. Manners, M.M. Ludlow and R.G. Henzell. 1993. DNA polymorphisms in grain sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. Theor Appl Genet 86:679-688
- Taramino, G., R. Tarchini, S. Ferraro, M. Lee and M.E. Pê. 1997. Characterization and mapping of simple sequence repeats (SSR) in *Sorghum bicolor*. Theor Appl Genet 95:66-72
- Tarchini, R., M. Sari-Gorla and M.E. Pê. 1993. Malegametophytic selection: perspectives for sorghum and pearl millet improvement. Use of Molecular Markers in Sorghum and Pearl Millet Breeding for Developing Countries. Eds. Wilcombe, J.R. and R.R. Duncan. Overseas Development Administration. Norwich, U.K. pp. 46-52
- Tuinstra, M.R., E.M. Grote, P.B. Goldsbrough and G. Ejeta. 1996. Identification of quantitative traits loci associated with pre-flowering drought tolerance in sorghum. CropSci 36:1337-1344
- Veldboom, L.R and M. Lee a. 1996. Genetic mapping of quantitative traits loci in maize in stress and nonstress environment: I. Grain yield and yield components. Crop Sci 36:1310-1319
- Veldboom, L.R and M. Lee. 1996 b. Genetic mapping of quantitative traits loci in maize in stress and nonstress environment: II. Plant height and flowering. Crop Sci 36:1320-1327
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kulper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res. 23:4407-4414
- Warner, J.P., M.A.R. Yuille and N.A. Affara. 1992. Genomic libraries and the development of species-specific probes. Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach. Ed. Hoelzel, A.R. IRL Press. Oxford University Press. pp. 189-223
- Whitkus, R., J. Doebley and M. Lee. 1992. Comparative genome mapping of sorghum and maize. Genetics 132:1119-1130
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 22:6531-6535
- Xu, Y. 1997. Quantitative trait loci: separating, pyramiding and cloning. Plant Breeding Reviews 15:85-139.

- γ Xu, G-W., C.W. Magill, K.F. Scertz and G.E. Hart. 1994. A RFLP linkage map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Theor Appl Genet* 89:135-145
- γ Yang, W., A.C. de Oliveira, I. Godwin, K. Schertz and J.L. Bennetzen. 1996. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in chinense sorghums. *CropSci* 36:1669-1676
- γ Yandell, B. 1995. QTL Cartographer. <http://www.stat.wisc.edu/biosci/qtlcart/qtlcart.html>
- γ Young, N.D. 1994. Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers. *DNA-Based Markers in Plants*. Eds. Phillips, R.L. and I.K. Vasik. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 39-57



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APÉNDICE

Protocolo 1

Aislamiento de DNA método del CTAB (modificado de Doyle and Doyle, 1988)

1. Precalentar buffer CTAB a 65°C
2. En tubos de polipropileno de 50 ml pesar 8 g de tejido fresco (sin nervaduras), fragmentar en pedazos pequeños, congelar con nitrógeno líquido moliendo hasta obtener consistencia como de talco.
3. Agregar 15 ml del buffer CTAB precalentado y agitar hasta suspender el tejido molido en el buffer.
4. Incubar a 60°C por 60 minutos. Mezclar en forma ocasional.
5. Agregar 10 ml de cloroformo-isoamil (24:1) y mezclar fuertemente.
6. Centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos.
7. Tomar el sobrenadante en tubos nuevo y repetir los pasos 5 y 6.
8. Tomar el sobrenadante en un tubo nuevo y agregar 2/3 partes del volumen de isopropanol helado, mezclar por inversión en forma suave.
9. Colocar a -20°C por 20 minutos para que el DNA precipite (opcional).
10. Centrifugar a 4000 rpm por 5 minutos.
11. Eliminar el sobrenadante y secar la pastilla al aire.
12. Agregar 10 ml de buffer de lavado de DNA, agitar de forma suave permitiendo que el buffer pase a través de la pastilla. Lavar por 20 minutos.
13. Centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos.
14. Eliminar el sobrenadante drenando muy bien permitiendo que la pastilla se seque al aire (puede ayudarse con un gancho de vidrio).
15. Resuspender el DNA en 1 ml de TE y agregar 1 µl de Rnasa (10 mg/ml), incubar a 37°C por 10 minutos o bien a temperatura ambiente por 30 minutos.
16. Ditur la muestra en 2 ml de dH₂O estéril, adicionar 1.5 ml de acetato de amonio 7.5 M y 10 ml de etanol frío. Mezclar suavemente para precipitar el DNA.
17. Centrifugar a 4500 rpm por 10 minutos.
18. Drenar y secar la pastilla al aire tomándola con un gancho de vidrio.
19. Resuspender en 400 µl de TE.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Protocolo 2

Aislamiento de DNA genómico

[basado en el método de Saghai-Marroof *et al.* (1984) (Hoisington *et al.*, 1994)]

1. Pesar 300-400 mg de tejido liofilizado y molido en tubos de 15 ml de polipropileno.
2. Agregar 9 ml de buffer CTAB precalentado a 65°C. Mezclar hasta suspender el tubo en el buffer.
3. Incubar 60-90 minutos con agitación continua a 65°C.
4. Esperar 4-5 minutos a que los tubos se enfrien antes de agregar 4.5 ml de cloroformo-octanol (24:1), mezclar suavemente por 10 minutos.
5. Centrifugar a 3200 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Tomar el sobrenadante en tubos nuevos de 15 ml, agregar nuevamente 4.5 ml de cloroformo-octanol y mezclar por 10 minutos.

7. Centrifugar a 3200 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Tomar el sobrenadante en tubos nuevos de 15 ml y agregar 30 μ l de RNasa A (10 mg/ml) (prehervida). Mezclar suavemente por inversión e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Agregar 6 ml de isopropanol, mezclar por inversión hasta precipitar el DNA.
10. Tomar el DNA con un gancho de vidrio y colocar en un tubo con 3-4 ml de solución de lavado 1, lavar por 20 minutos.
11. Lavar el DNA en 1-2 ml de solución de lavado 2. Sacar el DNA con el gancho de vidrio, secar levemente el exceso de sol. de lavado 2 con papel secante y transferir a un tubo de 1.5 ml con 400 μ l de TE.

Protocolo 3
Cuantificación de DNA por el método del fluorimetría
(fluorímetro TKO 100)

1. Prender el fluorímetro para que se caliente cuando menos 15 minutos antes.
2. Preparar la cantidad de solución de trabajo necesaria para las muestras en un matraz cubierto con papel aluminio de la siguiente manera:

Solución	Cantidad para 50 ml
Sol. Hoechst 1 mg/ml	10 μ l
TNE 10 X	5 ml
ddH ₂ O	45 ml

3. Calibración del aparato:
 - a. Pipetear 2 ml de solución de trabajo en la cubeta de cuarzo. Limpiar los lados de la cubeta e insertar dentro de la cavidad del fluorímetro (siempre orientada hacia el mismo lado).
 - b. Con el botón de "scale" girado totalmente hacia la izquierda, girar 5 vueltas en sentido de las manecillas del reloj.
 - c. Ajustar la lectura a 000 con el botón de "zero".
 - d. Agregar 2 μ l de solución estándar de DNA (concentración conocida) dentro de la cubeta, mezclar bien y reinsertar dentro del fluorímetro en la misma posición.
 - e. Ajustar con el botón "scale" la lectura hasta que sea igual a la concentración del estándar de DNA.
 - f. Estos pasos pueden repetirse hasta que la diferencia en las lecturas sea mínima.
4. Cuantificación de las muestras:
 - a. Enjuagar la cubeta con dH₂O, secar y pipetear 2 ml de solución de trabajo, limpiar el exterior de la cubeta e insertar en el fluorímetro (siempre en la misma orientación).
 - b. Con el botón de "zero" ajustar la lectura a 000, no mover el botón de "scale".
 - c. Agregar 2 μ l de la muestra de DNA en la cubeta, mezclar e insertar en el fluorímetro (en la misma posición).
 - d. Repetir los pasos a y c por cada muestra.
 - e. Si se tienen muchas muestras, checar la lectura de 000 de la solución de trabajo cada 10-15 muestras. La concentración se expresa en ng/ μ l.

Curva de calibración:

En caso de que no se pueda ajustar la lectura del estándar de DNA después de varias repeticiones, se hace una curva de calibración de la siguiente manera:

1. Preparar 3 ó más estándares de DNA.
2. Calibrar el aparato con la solución de trabajo en 000.
3. Agregar 2 μl del estándar de DNA de menor concentración y tomar la lectura.
4. Tomar la lectura de los otros estándares de DNA tomando la lectura de cada uno.
5. Con las concentraciones de los estándares y sus respectivas lecturas determinar la ecuación de la curva de calibración mediante un análisis de regresión en donde la concentración de DNA de los estándares corresponde a la variable "X" y los valores de las lecturas corresponden a la variable "Y".
6. Con los valores obtenidos para los β_0 y β_1 y las lecturas de las muestras de determina su concentración mediante la ecuación $x = (y - \beta_0) / \beta_1$. x es la concentración que se tiene en la muestra expresada en $\text{ng}/\mu\text{l}$.

Protocolo 4 Digestión de DNA

1. Con base en el siguiente cálculo por reacción y en la cantidad de carriles digeridos por la misma enzima se prepara un coctel de reacción sin el DNA.

Cálculo por reacción

Reactivo	Conc. final	Vol. a tomar
Buffer 10 X	1 X	3 μl
Espermidina 0.1 M	2.5 mM	0.75 μl
Enzima U/ μl variable	2.5 U/ μg	variable
DNA (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	-	20 μl
ddH ₂ O	-	variable
Volumen total de rx:		30 μl

La mezcla se incubaba a 37°C por un tiempo mínimo de una hora, para lograr una digestión total y completa se recomienda incubar de tres a cinco horas.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Protocolo 5 Electroforesis en geles de agarosa

1. Preparar 400 ml de TAE 1X, para un gel al 0.8% agregar 3.2 g de agarosa (gel de 20 X 25 cm, 36 carriles por peine y 30 μl de volumen por carril).
2. Fundir en el microondas la agarosa mezclando varias veces durante el calentamiento.
3. Mientras se enfría la agarosa preparar el molde sellando los lados con cinta adhesiva y colocándolo en una superficie nivelada.
4. Cuando la agarosa a alcanzado los 55°C aproximadamente, vaciar al molde lentamente.
5. Eliminar las burbujas con la punta del peine arrastrándolas hacia la orilla del molde. Colocar los peines y dejar que solidifique (20 minutos aproximadamente).

6. Una vez solidificado, retirar las cintas de los bordes del molde y colocar dentro del tanque de electroforesis. Llenar el tanque con buffer TAE 1X hasta 1 cm por arriba de la superficie del gel.
7. Cargar las muestras previamente teñidas con 3 μl de SGB 5X (10% del volumen total de carga).
8. Correr la electroforesis a 20 mA por 16-18 horas.
9. Remover el gel del tanque y del molde y teñir en 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio (100 μl de bromuro de etidio 10 mg/ml en 1 litro de dH_2O) por 20 minutos con agitación continua.
10. Enjuagar el gel en dH_2O por 20 minutos y visualizar en el transiluminador.
11. Fotografíar si se desea (Cámara Polaroid, película tipo 667 en f8 y 1 segundo de exposición) o bien con el programa Kodak Digital Science™.

Protocolo 6

Etiquetado con digoxigenina del marcador de peso molecular λ -HindIII (Hoisington et al., 1994)

1. Preparar la reacción de digestión de DNA λ con *Hind*III de acuerdo a los siguientes cálculos.

Reactivo	Conc. final	Vol. a tomar
Buffer 10 X	1 X	5 μl
Espermidina 0.1 M	2.5 mM	1.2 μl
<i>Hind</i> III (10U/ μl)	2 U/ μg	1 μl
DNA λ (0.45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	5 μg	11 μl
ddH ₂ O	-	31.8 μl
Volumen total de rx:		50 μl

2. Incubar a 37°C por 2-3 horas.
3. Precipitar el DNA digerido agregando 5 μl de acetato de sodio 2.5 M y 125 μl de etanol. Mezclar por inversión e incubar a -80°C por 30 minutos.
4. Centrifugar en una microcentrifuga por 10-15 minutos. Eliminar el supernadante e invertir el tubo para secar. Es importante permitir que la pastilla seque.
5. resuspender la pastilla en 15 μl ddH₂O, asumiendo poca pérdida o ninguna durante la precipitación, la concentración es cerca de 5 $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$ (0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).
6. Preparar la siguiente reacción para incorporar la digoxigenina al marcador.

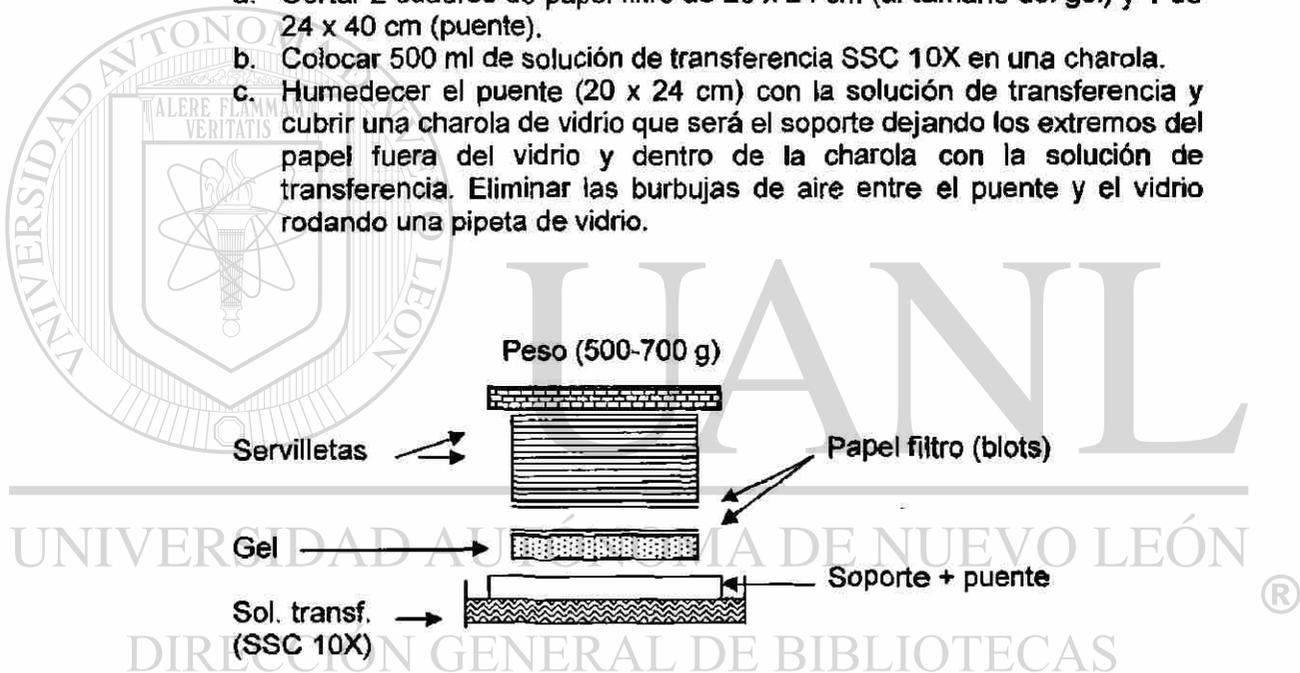
Reactivo	Conc. final	Vol. a tomar
Buffer Klenow 10X	1 X	5 μl
dATP 10 mM	100 μl	0.5 μl
dCTP 10 mM	100 μl	0.5 μl
dGTP 10 mM	100 μl	0.5 μl
dig-dUTP 1 mM	40 μl	2 μl
λ -DNA/ <i>Hind</i> III 0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	5 μg	15 μl
Klenow 2U/ μl	3 U	1.5 μl
ddH ₂ O	-	25 μl
Volumen total de rx:		50 μl

7. Incubar a 37°C por 1.5 horas.
8. Parar la reacción incubando a 65°C por 15 minutos.
9. Precipitar con etanol como el paso 3.

10. Resuspender en 250 μl de TE para tener una concentración final de 20 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Este stock puede diluirse a 10 ó 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$.
11. Checar la incorporación de digoxigenina como en el Protocolo 12.

Protocolo 7
Transferencia de DNA a membranas (Southern blotting)

1. Después de teñir el gel y observarlo en el transiluminador, transferirlo a una charola con solución de depurinación (hasta cubrir el gel), agitar por 20 minutos hasta que el azul de bromofenol se vuelva amarillo.
2. Lavar el gel con agua destilada.
3. Cubrir el gel con solución de desnaturalización y agitar por 35 minutos.
4. Construir la estación de transferencia de la siguiente manera:
 - a. Cortar 2 cuadros de papel filtro de 20 x 24 cm (al tamaño del gel) y 1 de 24 x 40 cm (puente).
 - b. Colocar 500 ml de solución de transferencia SSC 10X en una charola.
 - c. Humedecer el puente (20 x 24 cm) con la solución de transferencia y cubrir una charola de vidrio que será el soporte dejando los extremos del papel fuera del vidrio y dentro de la charola con la solución de transferencia. Eliminar las burbujas de aire entre el puente y el vidrio rodando una pipeta de vidrio.



5. Colocar el gel con la superficie superior hacia abajo encima del vidrio cubierto por el puente. Eliminar las burbujas entre el gel y el papel filtro (puente).
6. Cortar la membrana al tamaño del gel y humedecerla en solución de transferencia por 2-5 minutos.
7. Colocar la membrana encima del gel de una sola caída, remover las burbujas de aire entre membrana y gel rodando una pipeta de vidrio a manera de rodillo.
8. Humedecer los dos blots de papel filtro (20 X 24 cm) en solución de transferencia, colocar encima de la membrana eliminando las burbujas de aire.
9. Colocar servilletas cubriendo totalmente la superficie de los blots sin dejar huecos entre ellas, colocar una superficie plana encima y colocar un peso de 500-700 g.
10. Colocar cubierta plástica (kleen pack) entre las servilletas y el puente para evitar que entren en contacto y que la solución se mueva a través de ellos.

11. Dejar toda la noche (14-18 horas).
12. Fijación del DNA a la membrana (método alcalino):
 - a. Desmantelar la estación de transferencia.
 - b. Cortar dos cuadros de papel filtro más grandes que la membrana.
 - c. Preparar 100 ml de NaOH 0.4 M y remojar la membrana en esta solución.
 - d. Colocar la membrana entre los papeles filtro por 10 minutos.
 - e. Remojar la membrana en SSC 5X por 5 minutos.
 - f. Colocar nuevamente la membrana entre los papeles filtro.
 - g. Hornear por 1.5 horas a 70-80°C.
 - h. Sacar la membrana del horno y marcar poniendo una clave con un bolígrafo o plumón de marcado permanente.
 - i. Almacenar dentro de bolsas de plástico de cierre hermético a 4°C o temperatura ambiente.

Protocolo 8
Cultivo de bacterias en agar LB y medio líquido LB

1. En una campana de flujo laminar preparar cajas petri con 20 ml de medio LB agar, dejar solidificar.
2. Rayar las cajas con el stab de agar o de glicerol e incubar a 37°C por toda una noche.
3. Al día siguiente en una campana de flujo laminar preparar tubos de 15 ml de polipropileno con 10 ml de medio LB.
4. Con un asa, tomar una colonia de las cajas petri y cultivar en los tubos. Cultivar durante toda la noche a 37°C y con agitación continua.

Protocolo 9
Mini-preps de plásmidos
(Hoisington *et al.*, 1994)

1. Crecer en 10 ml de medio LB una colonia durante toda la noche.
2. Precipitar las células centrifugando a 3500 rpm durante 5 minutos, eliminar el sobrenadante.
3. Resuspender la pastilla formada en un vortex antes de adicionar 200 µl de solución I la cual contiene 5 mg/ml de lisozima (adicionar la lisozima 1 hora antes de usarse). Agitar nuevamente en vortex e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
4. Agregar 400 µl de solución II, mezclar suavemente e incubar 10 minutos en hielo (la solución debe tornarse clara).
5. Agregar 300 µl de solución III, mezclar suavemente e incubar 15 minutos en hielo.
6. Centrifugar por 15 minutos a 4000 rpm, pasar el sobrenadante en tubo de 1.5 ml.
7. Agregar 600 µl de isopropanol frío, mezclar e incubar a -20°C por una hora o a -80°C por 30 minutos, centrifugar por 5 minutos a 10000 rpm, drenar y secar el tubo al aire.

8. Redissolver la pastilla en 190 μ l de dH₂O. Mezclar en vortex por 45 minutos con movimiento suave.
9. Agregar 5 μ l de Rnasa A 1 mg/ml y 5 μ l de Rnasa T1 500 U/ml. Incubar a 37°C o a temperatura ambiente por 15 minutos.
10. Agregar 10 μ l de Proteinasa K 5 mg/ml. Incubar a 37°C o a temperatura ambiente por 20 minutos.
11. Agregar 200 μ l de fenol.
12. Centrifugar a 10000 rpm por 4 minutos. Transferir la fase acuosa (superior) a tubos nuevo para microcentrifuga.
13. Agregar 100 μ l de acetato de amonio 7.5 M para precipitar el DNA.
14. Agregar 800 μ l de etanol frío, mezclar en forma suave, incubar a -80°C por 30 minutos. Centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos. Descartar el sobrenadante.
15. Lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 75%, centrifugar por 4 minutos, eliminar el sobrenadante y secar el tubo al aire.
16. Disolver la pastilla en 50 μ l de TE pH 8.0

Protocolo 10
Etiquetado de sondas con digoxigenina por PCR
(modificado de Hoisington *et al.*, 1994)

1. Preparar una mezcla de reacción (100 μ l de reacción) que contenga los componentes enlistados abajo excepto el plásmido.

Reactivo	Conc. final	2.5% dig	5% dig
dH ₂ O	-	44.5 μ l	44.4 μ l
Buffer-Taq 10X	1X	10 μ l	10 μ l
MgCl ₂ 50 mM	2 mM	4 μ l	4 μ l
Glicerol	15 %	15 μ l	15 μ l
dATP, dCTP y dGTP 10 mM c/u	50 μ M c/u	1.5 (0.5 μ l c/u)	1.5 (0.5 μ l c/u)
dTTP 10 mM	48.75 ó 47.5 μ M	0.4875 μ l	0.475 μ l
Dig-dUTP 1 mM	1.25 ó 2.5 μ M	0.125 μ l	0.250 μ l
Taq polimerasa 5U/ μ l)	2 U	0.4 μ l	0.4 μ l
Iniciador M13 U ó T7 2 μ M	0.2 μ M	10 μ l	10 μ l
Iniciador M13 R ó SP6 2 μ M	0.2 μ M	10 μ l	10 μ l
Plásmido 5 ng/ μ l	20 ng	4 μ l	4 μ l

2. Agrega 96 μ l de la mezcla de reacción en tubos para PCR.
3. Agregar 4 μ l del plásmido en cada tubo. Mezclar y centrifugar.
4. Colocar dentro del termociclador
5. Amplificar siguiendo el siguiente programa térmico:

1 ciclo de:	25 ciclos de:	1 ciclo de:
94°C x 1 minuto	94°C x 1 minuto	72°C x 4 minutos
	55°C x 2 minutos	
	72°C x 4 minutos	
6. Cuantificar por fluorimetría (Protocolo 3).
7. Detectar la digoxigenina incorporada de acuerdo al Protocolo 11.

Protocolo 11
Método para detectar la incorporación de digoxigenina en sondas
(modificado de Hoisington *et al.*, 1994)

1. En un gel de agarosa al 1% cargar 10 μ l del producto de reacción, correr la electroforesis a 40 mA por 2 horas, teñir el gel con bromuro de etidio y desteñir con agua destilada.
2. Construir una estación de transferencia de la siguiente manera:
 - a) Colocar 2 cuadros de papel filtro más grandes que el gel mojados con solución de transferencia (SSC 10X).
 - b) Colocar el gel con la superficie superior hacia abajo eliminando las burbujas entre este y el papel filtro.
 - c) Colocar la membrana encima del gel procurando eliminar las burbujas de aire y encima de esta un papel filtro seco al tamaño del gel.
 - d) Colocar una fila de servilletas y un peso de 500 g encima de estas.
3. Transferir por toda la noche.
4. Desmantelar la estación de transferencia y lavar con solución SSC 2X por 5 minutos.
5. Hornear a 90°C por 1 hora.
6. Detectar la digoxigenina por medio de los siguientes lavados a la membrana:
 - a) Enjuague en buffer Tris-HCl 0.01M pH 7.5, NaCl 0.15M.
 - b) Lavado por 5 minutos en buffer Tris-HCl 0.01M pH 7.5, NaCl 0.15M, bloqueador 0.1%.
 - c) Incubar en antidigoxigenina por 10 minutos.
 - d) Lavar por 5 minutos en buffer Tris-HCl 0.01M pH 7.5, NaCl 0.15M.
 - e) Enjuagar en buffer Tris-HCl 0.10M pH 9.5, NaCl 0.10M.
 - f) Incubar en CSPD por 5-10 minutos.
7. Colocar la membrana con la superficie superior hacia abajo en cubierta plástica previamente extendida, envolverla y doblar los bordes de la cubierta sobre la superficie inferior.
8. Exponer la membrana a un film de rayos X por 45-60 minutos a 37°C.

Protocolo 12
Hibridación y detección de sondas etiquetadas con digoxigenina
(modificado de Hoisington *et al.*, 1994)

1. Prehibridar las membranas por 1-2 horas (4 horas la 1era. vez) en un horno a 65°C en una charola con suficiente solución de hibridación para humedecer todas las membranas.
2. Enrollar las membranas en una pipeta de vidrio orientada hacia uno de los extremos e insertar dentro de un tubo limpio de hibridación con algo de la solución de hibridación de la charola. Asegurarse de que las membranas no se enrollan en ellas mismas al girar en el horno de hibridación (síndrome de taco), tratar de no dejar burbujas de aire entre las membranas y las paredes del tubo. Se pueden colocar hasta 5 membranas de 500 cm² en una botella. Membranas pequeñas pueden colocarse en tubos de polipropileno de 15 ó 50 ml.
3. Agregar 2-3 ml/100 cm² de solución de hibridación para la primera membrana y 1 ml más por cada membrana extra de 500 cm², en membranas pequeñas se ajusta el volumen. La solución de hibridación debe contener al menos 100 ng/ml

de sonda etiquetada al 2.5-5% de digoxigenina (las sondas se desnaturalizan calentándose a 95°C por 10 minutos y enfriándose en hielo). Si la solución de hibridación contiene que ha sido utilizada previamente y almacenada en congelador, se desnaturaliza por 20 minutos a 95°C.

NOTA: Después del primer uso, la intensidad del signo en la membrana disminuye por lo que es necesario incrementar gradualmente la concentración de la sonda y/o del CSPD en cada re-uso.

4. Hibridar por 15-18 horas a 65°C en los tubos en el horno de hibridación.
5. Remover las membranas de los tubos y lavar juntas en charolas de acuerdo al tamaño de las membranas y con agitación continua de acuerdo a los siguientes pasos:

NOTA: La solución de hibridación con sonda puede almacenarse a -20°C para su re-uso.

- a) 2 lavados de 5 min en 0.15X SSC, 0.1% SDS a temperatura ambiente
 - b) 2 lavados de 10 minutos en 0.15X SSC, 0.1% SDS a 55°C
 - c) Enjuague en buffer Tris-HCl 0.01M pH 7.5, NaCl 0.15M
 - d) Incubar 30 minutos en buffer Tris-HCl 0.01M pH 7.5, NaCl 0.15M, bloqueador 0.1%
 - e) Incubar 30 minutos en antidigoxigenina
 - f) 3 lavados de 10 minutos en buffer Tris-HCl 0.01M pH 7.5, NaCl 0.15M, bloqueador 0.1%
 - g) 3 lavados de 10 minutos en buffer Tris-HCl 0.01M pH 7.5, NaCl 0.15M
 - h) 1 lavado de 5 minutos en buffer Tris-HCl 0.01M pH 9.5, NaCl 0.15M
 - i) Incubar 20 minutos en CSPD (5 ml/100 cm²)
6. Remover las membranas de la charola con CSPD, colocar una por una con la superficie superior hacia abajo en una cubierta plástica previamente extendida (Reynolds), colocar otra cubierta plástica en la superficie inferior de la membrana, cortar la película plástica y doblar los extremos de tal manera que queden hacia atrás de la membrana.
 7. Colocar las membranas dentro de los cassettes y exponerlas a películas de rayos X durante toda la noche.
 8. Revelar la película de rayos X por 6 minutos en revelador, enjuagar el agua por 30 segundos, fijar en líquido fijador por 3 minutos y enjuagar por ese mismo tiempo en agua corriendo.

NOTA: Si la señal es débil, las membranas pueden incubarse en concentraciones más altas de CSPD y reexponer la película de rayos X, se comienza con los lavados del Buffer 2 o Buffer 3.

9. Para asegurar la vida de las membranas, inmediatamente después de revelar se colocan en charolas con 0.1X SSC, 0.1% SDS ó con 2X SSC a temperatura ambiente.

Protocolo 13

Remoción de las sondas de las membranas para su reuso

1. En un recipiente con tapa y donde las membranas puedan colocarse en forma extendida poner solución de lavado 0.1X SSC, 0.1% SDS, colocar dentro de un horno a 90°C hasta que la solución alcance esta temperatura.

2. Cuando la solución alcanza los 90°C las membranas se colocan dentro del recipiente, se monitorea la temperatura para que no alcance más de 90°C, las membranas se dejan dentro de la solución por 10 minutos.
3. Se sacan las membranas inmediatamente y se colocan en un recipiente con suficiente solución de TE ó SSC 2X a temperatura ambiente. Se enjuagan con cualquiera de estas soluciones y se colocan con solución nueva.
4. Las membranas pueden permanecer ahí hasta su próxima hibridación (una semana aproximadamente) o bien pueden secarse al aire libre sobre papel filtro y almacenarse en bolsas de sello hermético a 4°C.

Protocolo 14 Microsatélites (SSR)

1. Preparar una mezcla de reacción (20 µl de reacción) que contenga los componentes enlistados abajo.

Reactivo	Conc. final	µl
dH ₂ O	-	3.52
Buffer Taq 10X	1X	2
MgCl ₂ 25 mM	2.5 mM	2
Glicerol	10 %	2
dNTP mezcla 10 mM	160 µM	0.48
Taq polimerasa (5U/µl)	1 U	0.2
Iniciador F 2.5µM	0.3 µM	2.4
Iniciador R 2.5 µM	0.3 µM	2.4
DNA molde 10 ng/µl	50 ng	5

2. Amplificar con el siguiente programa térmico:

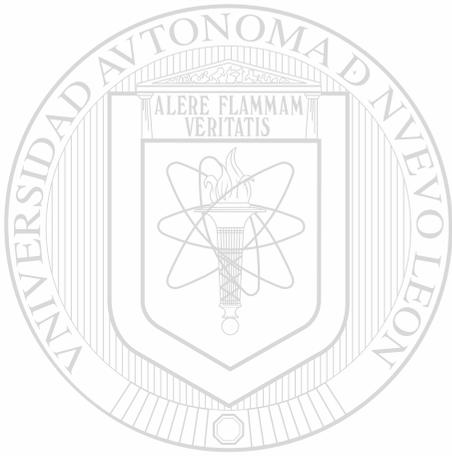
1 ciclo de:	35 ciclos de:	1 ciclo de:
93°C x 2 minuto	93°C x 1 minuto	72°C x 5 minutos
	52°C x 2 minutos*	
	72°C x 2 minutos	

*NOTA: La temperatura de alineación en algunos casos cambia dependiendo de los iniciadores utilizados

3. Separar los productos de amplificación en un gel de agarosa al 3% (1/2 de agarosa normal y 1/2 de agarosas de alta resolución) teñido con bromuro de etidio, correr a 80 volts por 2-3 horas (ver Materiales y Métodos).
4. Visualizar las bandas amplificadas en el transiluminador de UV y fotografiar el gel.

Cuadro 1A. Aleatorización de las familias dentro de los bloques

B1 R1	22830	F1	5	SJ7	4	9	8	6	1	2	10	3	7
B1 R2	1	6	5	2	4	3	SJ7	8	22830	10	7	9	F1
B2 R1	19	14	F1	18	16	12	13	11	15	20	22830	17	SJ7
B2 R2	15	11	13	F1	14	19	16	22830	SJ7	17	12	18	20
B3 R1	29	28	23	24	22	SJ7	22830	26	27	F1	30	25	21
B3 R2	24	21	29	22	SJ7	27	22830	23	26	30	F1	25	28
B4 R1	38	35	34	31	37	39	22830	33	F1	40	36	32	SJ7
B4 R2	34	33	F1	38	36	32	SJ7	35	31	22830	40	39	37
B5 R1	47	50	22830	F1	49	SJ7	44	41	42	43	48	46	45
B5 R2	F1	22830	43	50	46	49	SJ7	47	48	44	45	41	42
B6 R1	59	52	55	54	56	51	22830	57	F1	53	60	58	SJ7
B6 R2	60	51	58	52	SJ7	53	56	22830	59	55	F1	54	57
B7 R1	22830	65	F1	69	SJ7	67	68	61	70	63	62	64	66
B7 R2	F1	70	61	62	68	22830	64	SJ7	65	66	63	67	69
B8 R1	77	F1	74	75	22830	80	76	SJ7	78	72	79	71	73
B8 R2	75	F1	80	76	22830	SJ7	78	79	77	74	71	73	72



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cuadro 2A. Análisis de varianza de la variable altura de planta O-I 97

F.V	G.L	S.C	C.M	Valor F	P(F)
Bloques	5	1611.741	322.348	3.56	0.0084
Rep (bloques)	6	335.345	55.892	0.62	0.7155
Fam (bloques)	50	16296.218	325.924	3.60	0.0001
Error	46	4166.170	90.568		
Total	107	23394.762			

C.V: 9.905

Cuadro 3A. Análisis de varianza de la variable longitud de panoja O-I 97

F.V	G.L	S.C	C.M	Valor F	P(F)
Bloques	5	30.047	6.009	0.54	0.7474
Rep (bloques)	6	41.987	6.997	0.62	0.7094
Fam (bloques)	50	747.426	14.948	1.33	0.1618
Error	46	515.082	11.197		
Total	107	1348.956			

C.V: 14.070

Cuadro 4A. Análisis de varianza de la variable excersión O-I 97

F.V	G.L	S.C	C.M	Valor F	P(F)
Bloques	5	256.673	51.334	5.70	0.0004
Rep (bloques)	6	31.688	5.281	0.59	0.7397
Fam (bloques)	60	1582.894	31.657	3.51	0.0001
Error	46	414.611	9.013		
Total	107	2308.509			

C.V: 32.924

Cuadro 5A. Análisis de varianza de la variable días a floración O-I 97

F.V	G.L	S.C	C.M	Valor F	P(F)
Bloques	5	39.943	7.988	8.56	0.0022
Rep (bloques)	6	8.666	1.733	1.86	0.1893
Fam (bloques)	27	100.747	3.731	4.00	0.0130
Error	10	9.333	0.933		
Total	48	184.408			

C.V: 1.591

Cuadro 6A. Análisis de varianza de la variable altura de planta P-V 98

F.V	G.L	S.C	C.M	Valor F	P(F)
Bloques	7	9805.021	1400.717	20.13	0.0001
Rep (bloques)	8	2953.381	369.172	5.30	0.0001
Fam (bloques)	65	14930.558	229.700	3.30	0.0001
Error	52	3619.103	69.541		
Total	132	32862.431			

C.V: 10.699

Cuadro 7A. Análisis de varianza de la variable excersión P-V 98

F.V	G.L	S.C	C.M	Valor F	P(F)
Bloques	7	1060.604	151.514	4.66	0.0004
Rep (bloques)	8	506.936	63.367	1.95	0.0718
Fam (bloques)	65	3008.122	46.278	1.42	0.0938
Error	52	1689.133	32.483		
Total	132	6311.512			

C.V: 65.144

Cuadro 8A. Análisis de varianza de la variable longitud de panoja P-V 98

F.V	G.L	S.C	C.M	Valor F	P(F)
Bloques	7	594.300	84.900	12.82	0.0001
Rep (bloques)	8	191.048	23.881	3.61	0.0021
Fam (bloques)	65	1127.217	17.341	2.62	0.0002
Error	52	344.451	6.624		
Total	132	2243.449			

C.V: 10.672

Cuadro 9A. Análisis de varianza de la variable días a floración P-V 98

F.V	G.L	S.C	C.M	Valor F	P(F)
Bloques	7	61.475	8.782	2.94	0.0114
Rep (bloques)	8	81.534	10.191	3.41	0.0032
Fam (bloques)	65	382.285	5.881	1.97	0.0063
Error	52	155.465	2.989		
Total	132	661.518			

C.V: 2.844

Cuadro 10A. Análisis de varianza de la variable días a madurez fisiológica P-V 98

F.V	G.L	S.C	C.M	Valor F	P(F)
Bloques	7	43.362	6.194	0.72	0.6527
Rep (bloques)	8	160.713	20.089	2.35	0.0310
Fam (bloques)	65	591.759	9.103	1.06	0.4123
Error	52	445.286	8.563		
Total	132	1240.075			

C.V: 3.194

Cuadro 11A. Análisis de varianza de la variable rendimiento por planta P-V 98

F.V	G.L	S.C	C.M	Valor F	P(F)
Bloques	7	8309.007	1187.001	3.52	0.0037
Rep (bloques)	8	3647.195	455.899	1.35	0.2398
Fam (bloques)	62	15330.766	247.270	0.73	0.8780
Error	51	17187.199	337.003		
Total	128	48029.490			

C.V: 73.262

