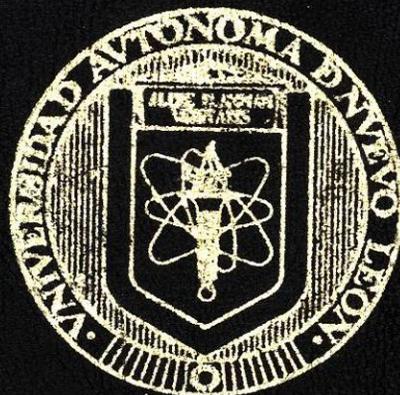


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



MEJORAMIENTO ASISTIDO POR MARCADORES
MOLECULARES DE LA CALIDAD NUTRICIONAL DEL
GRANO DE LA VARIEDAD DE MAIZ VS440 (Zea mays L.)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

PRESENTA

NASHIELY ELENA MOREIRA VELA

MARIN, N. L.

MAYO DE 2004

TL

SB191

.M2

M67

2004

c.1



1080171441

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



MEJORAMIENTO ASISTIDO POR MARCADORES
MOLECULARES DE LA CALIDAD NUTRICIONAL DEL
GRANO DE LA VARIEDAD DE MAIZ VS440 (Zea mays L.)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

PRESENTA

NASHIELY ELENA MOREIRA VELA

MARIN, N. L.

MAYO DE 2004



ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TITULO DE

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

COMITÉ PARTICULAR



Ph. D. Gilberto Eduardo Salinas García
Asesor Principal



Ph. D. Rigoberto González González
Asesor Auxiliar



M. Sc. José Elías Treviño Ramírez
Asesor Auxiliar

M. C. Cesar A. Reyes Méndez
Asesor Externo

AGRADECIMIENTOS

A mi país México por la paz con la que gozamos y la libertad que tenemos de estudiar y expresarnos.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por la oportunidad que me dio de estudiar. Por darme las herramientas necesarias para vivir, enseñar y servir a mis semejantes.

Expreso mi agradecimiento por Ph.D. Gilberto Eduardo Salinas García, al Ph.D. Rigoberto González González y al M.Sc. José Elías Treviño Ramírez por su ejemplo y ayuda durante mis estudios y la realización de esta tesis.

Al asesor externo M.C. Cesar A. Reyes Méndez por la asesoría dada durante la realización de este trabajo.

Al Campo Experimental Río Bravo del Centro de Investigaciones Regionales del Noreste del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por facilitar los materiales genéticos de maíz utilizadas en el estudio.

Al Sistema de Investigación Regional Alfonso Reyes del CONACYT por el financiamiento otorgado al proyecto “Mejoramiento de la Calidad Nutricional del Grano de Variedades de Maíz Adaptadas al Noroeste de México” (Clave 20000601002) dentro del cual se desarrolló este trabajo.

DEDICATORIA

A DIOS todo poderoso por haberme dado la oportunidad de vivir en este tiempo y darme tantas bendiciones cada día.

A JESUCRISTO mi Salvador, por pagar por mi y mostrarme el camino de regreso con Nuestro Padre Celestial.

A mis padres Carlos Moreira Flores y Ma. Elena Vela de Moreira por haberme dado la vida y su apoyo durante toda mi vida. Por ser los ángeles que Dios puso sobre la tierra para cuidarme, protegerme y enseñarme.

A todos mis hermanos y sobrinos: Verónica, Carlos G., Carlos, Ileana, Zazyl, Pepe, Verylu, Vania, Carla, Ramón, Abraham, Helaman y Rebecca.

Un amigo es para toda la vida y aunque estemos separado les agradezco por todos los buenos momentos. Gracias: Ximena, Arturo, Manuel, Yadelli, Pablo, Oscar, Javier, Verónica, Rafael y Julián.

A mis amigos Dafne, Diva, Azucena, Elías, Cesar, Abraham, Adrián, y Rolando agradezco a mis amigos por estar conmigo en tiempos difíciles y los cuales podré contar por toda la eternidad.

INDICE

Capítulo

	LISTA DE CUADROS.....	VII
	LISTA DE FIGURAS.....	IX
	LISTA DE CUADROS DEL APÉNDICE.....	X
	LISTA DE FIGURAS DEL APÉNDICE.....	XI
	RESUMEN.....	XII
1	INTRODUCCION.....	1
	Objetivos.....	4
	Hipótesis.....	4
2	REVISION DE LITERATURA.....	5
	2.1 Alimentación y estado nutricional de la población en México.....	5
	2.2 El maíz y la alimentación humana.....	11
	2.3 El desarrollo del maíz de alta calidad de proteína.....	13
	2.4 El uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético de plantas de maíz.....	18
	2.5 Conclusiones de la Revisión de Literatura.....	22
3	MATERIALES Y METODOS.....	23
	3.1 Material Genético.....	23
	3.2 Métodos de laboratorio.....	25
	3.2.1 Extracción del DNA.....	25
	3.2.2 Cuantificación del DNA.....	26
	3.2.3 Estandarización del DNA.....	26

3.2.4	Generación del marcador molecular ligado al gen <i>o2</i>	27
3.2.6	Electroforesis.....	28
3.3	Método de Análisis de Resultados.....	29
3.3.1	Genotipificación de plantas F2.....	29
3.4	Comparación de Protocolos para la extracción de DNA.....	30
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1	Cuantificación del DNA de las plantas de la población F2 V537C X	
	VS440.....	34
4.2	Segregación del locus <i>Opaco2</i> en la población F2 V537C X	
	VS440.....	34
4.3	Determinación de lisina y triptofano en plantas normales,	
	heterocigotos y homocigotos para el alelo <i>Opaco2</i> <i>recesivo</i>	45
4.4	Resultados de extracción del DNA.....	53
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	57
	BIBLIOGRAFIA.....	58
	APENDICE.....	62

LISTA DE CUADROS

Cuadro1	Consumo aparente de los principales productos agrícolas 1995- 99	5
Cuadro2	Consumo aparente de los principales productores pecuarios 1995-99	6
Cuadro3	Requerimientos mínimos de nutrimentos seleccionados según edad	7
Cuadro4	Estado Nutricional en niños menores de cinco años según Grupo de edad. 1999	8
Cuadro5	Programa de abasto social de leche según entidad federativa 1998 – 2000	9
Cuadro6	Programa de abasto social de tortilla según entidad federativa 1997- 1999	10
Cuadro7	Contenido nutricional de alimentos seleccionados	11
Cuadro8	Identificación de las plantas utilizadas para la extracción de DNA	24
Cuadro9	Componentes de la PCR tomando en cuenta una reacción.	27
Cuadro10	Tratamientos utilizados en el diseño experimental de extracción.	31
Cuadro11	Concentración del DNA ($\mu\text{g/ml}$) extraído de plantas F2 del V537c X VS440.	36
Cuadro12	Familias que fueron amplificadas divididas por O_2O_2 (plantas normales), O_2o_2 (plantas heterocigotos) y o_2o_2 plantas homocigotas para el alelo <i>Opaco2</i> recesivo.	44
Cuadro13	Contenido de Lisina y Triptofano en el endospermo y el grano entero en una muestra de plantas de maíz de la población V537CXVS440 (Genotipo 1= O_2O_2 ; 2= O_2o_2 ; 3= o_2o_2)	49
Cuadro 14	Análisis de varianza para el contenido de lisina en el endospermo	50
		50

Cuadro 15	Análisis de varianza para el contenido de lisina en el grano completo	
Cuadro 16	Análisis de varianza para el contenido de triptófano en el grano completo	50
Cuadro 17	Análisis de varianza para el contenido de triptófano en el grano completo	50
Cuadro 18	Comparación de medias para el contenido de lisina y triptófano en el endospermo y en grano (%).	51 51
Cuadro 19	Calidad de la proteína de maíz normal y QPM	
Cuadro 20	Prueba de homogeneidad de varianzas entre genotipos de maíz para las variables asociadas a la calidad proteínica	51
Cuadro 21	Plantas homocigóticas para el alelo <i>Opaco2</i> recesivo (o_2o_2), de la población VS440 x V537C identificadas por medio del microsatélite umc 1066	52
Cuadro 22	Concentración de la solución de DNA extraído de una planta normal (33) y una QPM (26) estimada en $\mu\text{g/ml}$ de DNA	53
Cuadro 23	Análisis de varianza para la concentración de la solución de DNA ($\mu\text{g/ml}$) obtenida con tres métodos de extracción	56
Cuadro 24	Media, error estándar e intervalo de confianza de la concentración del DNA producido por los métodos de extracción probados	56

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Gel de agarosa con 7 carriles: 1- marcador molecular, 2 control negativo, 3- progenitor V537C, 4- progenitor V-440, 5- planta homocigota positiva 6- planta heterocigota y 7- planta homocigota negativa..... 30
- Figura 2 Fotografía del barrido de los métodos de extracción..... 54

APENDICE

Lista de Cuadros

Cuadro 1A Preparación de la solución de Hoesch.....	62
Cuadro 2A Solución TEN.....	62
Cuadro 3A Solución de trabajo TBE al 0.5.....	62
Cuadro 4A Preparación de soluciones para el método Hu y Quiroz.....	63

LISTA DE FIGURAS DEL APENDICE

Figura		Página
1A	Gel 1.....	64
2A	Gel 2.....	64
3A	Gel 3.....	65
4A	Gel 4.....	65
5A	Gel 5.....	66
6A	Gel 6.....	66
7A	Gel 7.....	67
8A	Gel 8.....	67
9A	Gel 9.....	68
10A	Gel 10.....	68
11A	Gel 11.....	70
12A	Gel 12.....	70
13A	Gel 13.....	71

RESUMEN

La calidad nutricional del grano de maíz puede ser incrementada por la introgresión del gen mutante *Opaco2* al duplicar el contenido de los amino ácidos lisina y triptofano; este gen incrementa de la calidad proteínica del endospermo. Para la detección rápida del gen se pueden utilizar marcadores moleculares.

El objetivo principal de esta investigación fue la identificación de plantas F2 provenientes del cruzamiento V537C X VS440, que contenían el gen *Opaco2*. Adicionalmente se probaron tres métodos de extracción de DNA (Doyle y Doyle, (1990) modificado, Hu y Quiros y DNAzol®ES). Buscando reducir costos y obteniendo el rendimiento y la calidad adecuados para la generación de marcadores de tipo SSR. Estos métodos se probaron en plantas de maíz mutante *Opaco2* y plantas de maíz normales.

Se utilizaron plantas F2 provenientes del cruzamiento entre V537C X VS440. A cada planta se le extrajo el DNA por medio del método de Doyle y Doyle (1990) modificado. Se cuantificó la concentración de DNA por medio de flourimetría. La técnica de marcadores fue la de SSR o microsatélites, amplificando por medio del primer UMC1066. El marcador citado se encuentra completamente ligado al gen *Opaco2*.

De las 504 plantas que se analizaron se encontró un 10.09% de plantas normales, un 13.76% de plantas heterocigotas y un 54.40% de plantas homocigotas para el alelo *Opaco2* recesivo.

1. INTRODUCCION

El maíz ha sido calificado como una causa de dicha y de desgracia. La dicha por dar el sustento básico que le ha permitido a México desarrollarse culturalmente en todas sus formas. Pero también es causa de desgracia debido a sus deficiencias nutritivas que se reflejan en la salud y el desarrollo de los individuos y de todo el pueblo en su conjunto (Chávez, 1972). Tenemos una cultura basada en el maíz, lo que nos hace un pueblo desnutrido por la falta de algunos de los aminoácidos esenciales para vivir.

La desnutrición afecta principalmente al niño menor de seis años, ya que depende para su alimentación enteramente de terceros; que muchas veces no tienen los recursos económicos suficientes o carecen de un nivel cultural o de educación como para cumplir adecuadamente con ese rol. La desnutrición puede causar daños irreparables en las mentes y los cuerpos infantiles y así debilitar el desarrollo integral de sus vidas (UNICEF, 2002).

Los cereales son la fuente principal de calorías y proteínas en la dieta de la población de grandes grupos humanos. En 1968, la FAO informó que a nivel mundial, el trigo aporta el 38.4%, el maíz 22.5% y el arroz un 20.9% como fuentes de proteína.. Los datos anteriores indican la importancia de mejorar la calidad proteínica del grano de maíz (Reyes, 1990).

El maíz es rico en carbohidratos y desequilibrado en sus proteínas, vitaminas y minerales. La deficiencia principal son los dos aminoácidos esenciales que son la lisina y el triptofano. Los animales monogástricos y los humanos no pueden sintetizar aminoácidos esenciales y deben de obtenerlos por la síntesis de proteína. El valor biológico de la proteína normal del maíz limita a los animales monogástricos y a los humanos por la composición poco favorable del maíz (Bjarnason, 1992).

Al comparar la proteína de origen animal con la del maíz se puede apreciar el bajo valor nutricional de este último. Esta deficiencia es causada por un desbalance de aminoácidos y del bajo contenido proteínico. Es en el endospermo del maíz donde se encuentra la mayor cantidad de proteína, teniendo un 75 a un 85% de la proteína total contenida en el grano. La proteína del maíz es deficiente de dos aminoácidos esenciales, la lisina y el triptofano (Reyes, 1990).

El maíz normal de la raza tuxpeño contiene en promedio 1.5 gramos de lisina, comparándolo con un maíz que contiene el gen *Opaco2*, el cuál tiene 3.8 gramos de lisina por cada 100 gramos de proteína. Las cantidades de triptofano en un maíz normal es de 0.3 gramos por cada 100 gramos y uno con el gen *Opaco2* tiene 0.9 gramos. Se puede decir que al reducir la cantidad de zeína sintetizada en el maíz esto consecuentemente trae el aumento de lisina (Villegaz, 1972). El alto valor biológico de la proteína del maíz conteniendo el gen *Opaco2* recesivo se ha confirmado en diversos experimentos en animales monogástricos (Reyes, 1990).

La transferencia del gen *Opaco2* se ha llevado a cabo en líneas puras (progenitores de híbridos) y en variedades comerciales adaptadas a zonas agrícolas definidas. El método consiste en un proceso de retrocruzamiento y autofecundación, en el cuál el progenitor recurrente es una variedad utilizada por los agricultores o una línea que es progenitora de híbridos comerciales, y el progenitor donador es una línea o variedad portadora del gen mutante *Opaco2*. Después de suficientes retrocruzas (5 a 8), generalmente se logra recuperar la variedad adaptada o línea pura con la mayoría de sus características originales, pero además con el gen *Opaco2* en condición homocigótica recesiva (o_2o_2) (Reyes, 1990).

En países como Brasil, Colombia, Estados Unidos y México, se realizaron programas de mejoramiento genéticos, donde se desarrollaron variedades de alta calidad nutritiva basadas exclusivamente en la incorporación del gen *Opaco2*. Los problemas que tuvo el maíz opaco en su comercialización, al compararlo al maíz normal comercialmente, fue el tener un bajo rendimiento del grano. El grano suave y de apariencia “yesosa”, hace que los consumidores lo rechace y aún con eso causa que sea difícil de secar. Asimismo, por sus características suaves, el maíz opaco es más susceptible a plagas y a enfermedades (Wessel- Beaver, 1985).

Los marcadores moleculares son secuencias “pequeñas” del DNA en el genoma de una especie o proteínas, que se pueden utilizar para informar de la presencia de un alelo en un individuo en particular (Dreher, 2000).

La técnica de marcadores moleculares puede utilizarse con muestras de DNA sacadas de tejido de plantas. Esta técnica permite identificar en estados muy jóvenes el gen buscado. Esto permite descartar plantas que no contengan el alelo mutante *Opaco2* y no tener que esperar hasta el ciclo de floración (Dreher, 2000).

OBJETIVOS

Identificar las plantas F₂ provenientes del cruzamiento V537C X VS440, conteniendo el gen *Opaco2* en condición homocigótica recesiva (alta calidad de proteína) por medio de marcadores moleculares del tipo microsatélite.

Evaluar tres métodos de extracción de DNA evaluando el método que sea más económico y el método con mayor claridad. Esto se realizará sobre plantas de maíz QPM y en plantas de maíz normales.

HIPÓTESIS

El microsatélite umc1066 esta dentro del gen *Opaco2* y es útil para distinguir plantas normales de las de endospermo *Opaco*.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Alimentación y estado nutricional de la población en México

Uno de los principales problemas que la actualidad tenemos en las poblaciones del mundo son la malnutrición y la desnutrición. Las condiciones existentes son muy diferentes entre las diversas regiones del mundo. En países altamente industrializados o desarrollados tienen suficiente alimentos en suficiente cantidad. En países en desarrollo donde las dos terceras partes de la población son niños que se encuentra con una deficiencia calórico-proteica (Villegas, 1972).

Del Cuadro 1 vemos los granos básicos más consumidos por los mexicanos es el maíz seguido por el trigo. Las frutas que mas consumen son la naranja y el plátano.

Cuadro 1. Consumo aparente de los principales productos agrícolas 1995- 99
(Miles de toneladas)

PRODUCTO	1995	1996	1997	1998	1999
GRANOS BÁSICOS					
FRIJOL	1214	1474	1048	1457	1179
MAÍZ	20957	23824	20043	23535	23238
TRIGO	4259	5253	5056	4504	5346
FRUTAS					
NARANJA	3566	3102	2873	3342	3491
PLATANO	1863	2047	1474	1277	1564
MANGO	1210	1025	1314	1271	1305

Fuente: INEGI Dirección General de Estadística. Elaborado con base en información obtenida de: 1995-98: SAGAR. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los

Estados Unidos Mexicanos. Para 1999: SAGARPA: Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. INEGI. Anuario Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos (varios años). (INEGI, 2001)

Las proteínas de origen animal tienen un contenido bien balanceado de aminoácidos por lo que son de calidad nutritiva mayor que la proteína vegetal que por lo general son deficientes en uno o más aminoácidos esenciales para la dieta humana. Lo ideal sería la producción de proteína animal pero esta no puede ser expandida de una manera rápida y fácil. Por otro lado las proteínas animales son muy caras cuando se les compara con las proteínas vegetales (Villegas, 1972).

En el Cuadro 2 vemos el consumo de productos pecuarios. Podemos ver como el pollo ha incrementado la cantidad de toneladas consumidas. Mientras que la carne de bovino incrementa en porciones más pequeñas y la carne de porcinos no tiene un incremento tan notable como el pollo. El huevo tiene un incremento en el consumo al paso de los años.

Cuadro 2. Consumo aparente de los principales productores pecuarios 1995-99 (toneladas)

PRODUCTO	1995	1996	1997	1998	1999
Carne en canal					
Bovino	1 287 133	1 392 983	1 470 793	1 570 676	1 582 893
Porcinos y productos	1 081 819	10 175 829	1 112 418	1 218 152	1 270 487
Pollo	1 396 599	1 394 165	1 609 483	1 799 886	1 931 332
Otros productos pecuarios					
Huevo	1 249 488	1 245 047	1 341 191	1 472 752	1 642 976

Fuente: SAGARPA. Dirección general de ganadería. (INEGI, 2001)

En el Cuadro 3 vemos los requerimientos mínimo de nutrición en hombres y mujeres entre los 18 a más años. A pesar que la cantidad de energía es descendente para los adultos vemos que la cantidad de proteínas es la misma sin importar la cantidad de energía necesaria.

Cuadro 3. Requerimientos mínimos de nutrimentos seleccionados según edad

EDAD	Peso Teórico Kg	Energía (Kcal.)	Proteínas (g)	Hierro (mg)
Hombres				
18-34 años	65	2750	80	500
35- 54 años	65	2500	80	500
55 y más años	65	2250	80	500
Mujeres				
18-34 años	55	2000	71	500
35- 54 años	55	1850	71	500
55 y más años	55	1700	71	500

Fuente: CONAL- INNSZ. Tablas de uso Práctico del Valor Nutritivo de los Alimentos de Mayor Consumo en México, 1992. (INEGI, 2001)

En el Cuadro 4 vemos el estado nutricional en niños de 1 a 5 años. Vemos que entre los 12 a 35 meses existen mayores casos de desmendo y bajo peso.

Cuadro 4. Estado Nutricional en niños menores de cinco años según Grupo de edad. 1999

Grupo de Edad	Desmadró		Bajo Peso		Emación		Sobrepeso	
	Población por ciento (Miles)	a/	Población (Miles)	Por ciento a/	Población (Miles)	Por ciento a/	Población (Miles)	Por ciento a/
Total	1592.1	17.7	695.1	7.5	184.1	2.0	487.1	5.3
0 a 11 meses	142.8	8.2	63.2	3.4	46.0	2.5	121.9	6.7
12 a 23 meses	372.9	21.6	200.1	11.2	59.1	3.4	117.0	6.7
24 a 35 meses	338.7	18.8	153.2	8.2	33.5	1.8	68.8	3.8
36 a 47 meses	389.3	20.9	154.2	8.2	18.1	1.0	94.4	5.1
48 a 59 meses	348.4	18.6	124.4	6.5	27.4	1.5	85.0	4.5

a/ Con relación al total de población expandida a partir de los casos estudiados.

Fuente: Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Nutrición 1999. Tomo 1. Niños menores de 5 años. (INEGI, 2001)

Nota: Los datos proceden de una encuesta probabilística y representativa del ámbito nacional, de localidades urbanas y rurales.

La clasificación que se presenta en este cuadro se basa en los patrones internacionales de referencia que la Organización Mundial de la Salud ha definido para clasificar a los niños como desnutridos o con sobrepeso u obesidad, de acuerdo a los siguientes rangos:

- Desnutridos: Cuando los valores de peso o estatura para la edad se encuentran debajo de menos 2 desviaciones estándar (D.E.) del patrón de referencia.
- Bajo talla o desmadró: Cuando la estatura para la edad se encuentra por de bajo de -2 D.E. del patrón de referencia.
- Bajo Peso: Cuando el peso con relación a la edad se ubica por debajo de -2 D.E. del patrón de referencia.
- Emación o bajo de peso: Cuando el peso para la estatura se encuentra por debajo de -2 D.E. del patrón de referencia.
- Sobrepeso y obesidad: Cuando el peso para la estatura se encuentra por arriba de +2 D.E. del patrón de referencia.

En el Cuadro 5 encontramos la estadística del programa federal de abasto de leche. En los tres estados podemos ver como los beneficiarios van bajando su consumo.

Cuadro 5. Programa de abasto social de leche según entidad federativa 1998 – 2000

Entidad Federativa	1998		
	Establecimientos	Beneficiarios	Participación %
Coahuila de Zaragoza	119	44142	0.9
Nuevo León	210	74129	1.6
Tamaulipas	142	66586	1.4

Entidad Federativa	1999		
	Establecimientos	Beneficiarios	Participación %
Coahuila de Zaragoza	114	35328	0.8
Nuevo León	210	63871	1.5
Tamaulipas	141	45637	1.1

Entidad Federativa	2000		
	Establecimientos	Beneficiarios	Participación %
Coahuila de Zaragoza	103	35304	0.8
Nuevo León	222	63980	1.5
Tamaulipas	157	45542	1.1

Fuente: LICONSA. Dirección de Planeación. (INEGI, 2001)

En el Cuadro 6 se presentan los resultados del programa de abasto social de tortilla, en este podemos ver como los beneficiarios van teniendo menos consumo y un salto muy grande entre los años 1997 al 1998 que casi decreció su consumo a la mitad como respuesta al recorte de establecimientos. Esto no implica que el consumo de tortillas consumidas se reduzca si no más bien que los consumidores sin el programa social tienen que comprarlas.

Cuadro 6. Programa de abasto social de tortilla según entidad federativa 1997- 1999

Entidad Federativa	1997		
	Establecimientos	Beneficiarios	Participación %
Coahuila de Zaragoza	474	80073	4.3
Nuevo León	572	96791	5.2
Tamaulipas	517	75168	4

Entidad Federativa	1998		
	Establecimientos	Beneficiarios	Participación %
Coahuila de Zaragoza	386	46165	4
Nuevo León	424	53933	4.7
Tamaulipas	413	44034	3.8

Entidad Federativa	2000		
	Establecimientos	Beneficiarios	Participación %
Coahuila de Zaragoza	280	47891	4
Nuevo León	297	52278	4.4
Tamaulipas	255	38406	3.2

Fuente: FIDELIST. Dirección de planeación e informática. (INEGI, 2001)

2.2 El maíz y la alimentación humana

A nivel mundial el maíz es el alimento mas utilizado para el consumo humano. El maíz es el grano con el que se produce una mayor diversidad de productos industriales. Estos productos se pueden dividir en categorías como lo es el alimento para ganado, el proceso en seco para harinas, el procesado en húmedo, y las industrias de fermentación y destilación. Otros derivados de estos son: el gluten, torta de harina, almidón, jarabe, azúcar, aceite, dextrina, alcohol etílico, acetona y whiskey (Jugenheimer, 1981).

En el Cuadro 7 vemos el contenido nutricional en los alimentos con base de maíz.

Cuadro 7. Contenido nutricional de alimentos seleccionados

(Por cada 100 gramos de alimento crudo en peso neto)

ALIMENTO	PORCION COMESTIBLE %	HUMEDAD %	FIBRA (g)	ENERGIA (kcal)	PROTEINAS (g)	CALCIO (mg)
Harina	100	7.1	9.5	377.0	7.1	140.0
Nixtamalizada						
Hojuelas de Maíz	100	2.6	2.0	389.0	8.1	3.0
Maicena	100	13.5	0.2	357.0	0.6	8.0
Maíz Amarillo	92	13.8	12.2	350.0	8.3	158.0
Maíz Blanco	92	10.6	12.2	362.0	7.9	159.0
Masa Tratada con Cal (maíz blanco)	100	62.2	3.4	154.0	3.5	70.0
Tortillas de Maíz Amarillo	100	47.5	2.1	214	4.6	196.0

Fuente: CONAL-INNSZ. Tablas de uso practico del valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en México, (1992) (INEGI, 2001)

En México se utiliza en mayor proporción la tortilla de maíz, o maseca o sea el maíz nixtamalizado para la alimentación. El país tiene el programa de abasto social de tortilla, como un programa socio económico. Se tiene la frase popular que la tortilla es plato, cuchara y alimento. En el Cuadro 6 se encuentra la estadística del programa con los beneficiados por el programa.

La calidad nutritiva del maíz se miden en conceptos bioquímicos o nutricionales que no necesariamente van relacionado con los efectos genéticos que se desean controlar. La concentración de alguna proteína en el endospermo podría ser causada por efectos ambientales durante diferentes épocas del desarrollo de la planta dando como resultado cadenas metabólicas y causando que la formación de la proteína se haga difícil de controlar e identificar (Poey, 1972).

Los parámetros son expresados en porcentajes y hace que los efectos genéticos y ambientales controlen los componentes del grano y estará influyendo en la variable. La proteína puede medirse en unidades absolutas mas no relativas. Esto no refleja necesariamente el valor alimenticio total del grano (Poey, 1972).

Conociendo que el objetivo principal es mejorar el valor nutritivo del grano es esencial conocer el tipo de proteína y las cantidades y calidades con las que estas se presentan (Poey, 1972).

Podemos encontrar en el endospermo un 80 a 85% de la proteína total del grano, pero es de muy baja calidad nutricional por la concentración de la prolamina zeína y de muy poco o sin ningún contenido de aminoácidos esenciales. Dentro del embrión se encuentra del 20 al 25% de proteínas que es de muy buena calidad por las concentraciones de albúmina y globulina. Entendiendo esto se comprende que el endospermo y su estructura merecen un mejoramiento. Los genes *Opaco2* y *Harinoso2* modifican precisamente esta estructura (Poey, 1972).

2.3 El desarrollo del maíz de alta calidad de proteína

Los genes *Opaco2* y *Harinoso2* fueron descubiertos por Jones y Singleton en Connecticut. El gen *Opaco2* fue localizado en el brazo del cromosoma 7. Las variedades de maíz portadoras del gen *Opaco2* tienen un grano con apariencia suave y opaca, lo que también se puede apreciar debido a la presencia de otros genes mutantes, pero sólo el *Opaco2* y *Harinoso2* producen cambios en la composición química de la proteína (Villegas, 1972).

Con los descubrimientos de la mutación del endospermo se ha abierto un nuevo campo de investigación para mejorar la calidad proteica del grano de maíz. En 1963 y 1964, un grupo de científicos de la Universidad de Purdue, Indiana, Estados Unidos, descubrieron el efecto de los genes mutantes *Opaco2* y *Harinoso2* del endospermo del grano. Ambos genes se habían identificado desde hace muchos años, pero se desconocía su

efecto en el balance de los aminoácidos. El *Opaco2* (*o2*) fue descubierto por Singleton y Jones y está localizado en el cromosoma 7 (Wessel- Beaver, 1982).

Cuando se vió la posibilidad de mejorar la calidad nutricional del maíz fue cuando la Universidad de Purdue, Indiana, Estados Unidos descubrió el gran efecto que tiene los genes *Opaco2* y *Harinoso2* en la proteína del endospermo del maíz. Llevaban años conociendo estos genes y eran utilizados como marcadores moleculares pero no se conocía el efecto en el balance de aminoácidos (Villegas, 1972).

El gen *Opaco2* es heredado como un carácter simple recesivo. Los genes mejoran el valor nutritivo del maíz ya que la proteína de su endospermo contiene más del doble de triptofano y lisina que la proteína del endospermo de un maíz normal (Villegas, 1972).

El *Opaco2* es de herencia simple y el *Harinoso2* es parcialmente dominante. Ambos genes mejoran el valor nutritivo del maíz ya que la proteína de su endospermo contiene más del doble de triptofano y lisina que la del maíz normal (Villegas, 1972).

El carácter harinoso del maíz *Opaco2* no está ligado completamente al mayor contenido de lisina y triptofano, Brauman y Aycock (1966) observaron en poblaciones segregantes de *Opaco2* granos de fenotipo parcialmente viteo y el resto opaco y concluyeron que los genes modificadores que actúan sobre la expresión del *Opaco2* son definitivamente heredables. Resultados similares fueron encontrados por Páez *et al* (1969),

quienes fueron los primeros en informar la posibilidad de modificar la estructura del *Opaco2*; ellos encontraron que en los granos modificados la fracción de 50% de endospermo corneo comparada con la fracción 50% opaca del mismo grano tuvieron prácticamente la misma cantidad de lisina en las muestras. Por otra parte, (Brauman y Padilla y Bustos 1974,) encontraron que los granos modificados fueron de calidad proteínica similar a la de los opacos (Bjarnason, 1992).

En 1964 Mertz en su trabajo encontró que el gen *Opaco2* induce un incremento del 69% en el contenido del endospermo en comparación de un maíz normal lo cual es más del doble del que contiene el endospermo normal (1.3%).

En 1982 Wessel-Beaver en su trabajo “Control genético de la modificación de la textura del endospermo en maíz *Opaco2*” declaró lo siguiente. “El maíz con alta lisina o sea con el gen *Opaco2*, no a llegado a tener gran importancia por sus problemas asociados con los caracteres de su semilla. Una solución podría ser modificar los genes que cambian el fenotipo del endospermo” (Wassel- Beaver,1982).

Se realizaron en el Colegio de Postgraduados y en el CIMMYT los cambios en el contenido de proteína total en el endospermo de maíces *Opaco2* y *Harinoso2*. Se concluyo que el gen *Opaco2* tiende a reducir la proteína total del endospermo en comparación al mismo material sin ser mutuante. El gen *Harinoso2* obtuvieron resultados muy variables y se registraron aumentos significativos, pero solo en alguno de los casos (Poey, 1972). Por su inestabilidad el gen *Harinoso2* no se utiliza como una alternativa.

Los mutantes *Opaco2* y *Harinoso2* son fenotípicamente semejantes por su apariencia suave y opaca del grano, semejantes también a los mutantes *Opacol* (o1), *Floury1* (fl1) y *Soft- Starch* (h) pero solamente los 2 primeros producen cambios favorables en el balance de los aminoácidos. La forma de herencia ha sido reportada por Emerson, et al (1935). El *Opaco2* es de herencia simple y el *Harinoso2* es parcialmente dominante. Ambos genes mejoran el valor nutritivo del maíz ya que la proteína de su endospermo contiene mas del doble de triptófano y lisina que la del maíz normal (Bjarnason, 1992).

Los problemas con la producción comercial para la utilización del maíz opaco se origina en su estructura de un endospermo blando y harinoso lo cual es causada por la utilización del gen *Opaco2* para mejorar la calidad nutricional. Su estructura blanda provoca que tenga un peso menor al grano, incrementando su susceptibilidad a plagas y enfermedades. Esto también implica un rechazo al consumidor al aceptar un maíz diferente al común (Poey, 1972).

El maíz *Opaco2* tiene ciertos problemas relacionados con el aspecto agronómico que es importante resolver. El maíz opaco es menos denso que el maíz común, lo cual afecta el rendimiento. Algunos de los genotipos con *Opaco2* son más susceptibles a las enfermedades, placas por su endospermo suave. Se debe trabajar para corregir los defectos y mantener el alto valor nutricional (Villegas, 1972).

Varios estudios han indicado que el endospermo modificado es heredado cuantitativamente. Wessel- Beaver y Lambert encontraron la acción de genes dominantes y recesivos en activos donde el endosperma modificado estaba relacionado. Varios autores han concluido que al agregar varianza genética es importante en la modificación del endospermo (Wessel- Beaver, 1982).

Los fitomejoradores han sugerido que la textura del endospermo debe ser modificado para solucionar los problemas asociados con el maíz *Opaco2*. En 1970 Gupta encontró la textura modificada del maíz *Opaco2* sin perder sus características nutritivas. Se encontró que las diferentes cruzas recíprocas en el endospermo modificado causaban diferencias en los efectos del endospermo (Wessel- Beaver, 1982).

Para convertir variedades de maíz con endospermo normal en endospermo con alta calidad de proteína se sigue el método llamado retrocruzas. Esto se realiza haciendo cruzamientos a plantas adaptadas con otras que son portadoras del gen o genes que interesan introducir. Se repite los cruzamientos en las progenies de las cruzas con plantas adaptadas desde 4 hasta 6 generaciones. Cada generación se va seleccionando las plantas que manifiesten las características deseadas. Se logra recuperar la constitución genética de la variedad adaptada con la adición de la característica incorporada (Poey, 1972).

Una variedad QPM es aquella que tiene un endosperma de textura modificada o vitriosa. Este endospermo modificado del maíz *Opaco2* es fenotípicamente similar al endospermo normal de un maíz pero es homocigoto con el alelo de *Opaco2*. (Wessel- Beaver, 1985). Las variedades solo con el gen mutante *Opaco2* es el que se encuentra con grano suave, una apariencia hulsosa, lo cual provoca una dificultad para el secado de grano y una mayor susceptibilidad a plagas (Bjarnason, 1992).

2.4 El uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético de plantas de maíz

Los marcadores moleculares son partes pequeñas del DNA que corresponden en particular a secuencias del DNA en el genoma de una planta, y puede informar de la presencia de un alelo deseable de una planta en particular (Dreher, 2000).

Los marcadores de microsatélites, son secuencias cortas repetitivas de DNA encontradas en la mayoría de los genomas de las plantas. Como el número de marcadores de secuencia repetitivo presenta una locación en particular en el genoma tiende a ser diferente en cada planta por lo que los marcadores de secuencia repetitiva puede determinar la ausencia o presencia de un alelo específico (Dreher, 2000).

Los marcadores moleculares basados en el DNA se dividen en tres categorías básicas. La primera categoría se basa en métodos que no utilizan PCR y son usados con sondas como lo es el Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

y repeticiones entandem de números variables (VNTR). La segunda categoría incluye a los iniciadores de secuencia arbitraria. Un ejemplo es DNA polimorfo amplificado al azar (RAPD), DNA en la región de minisatélites (DAMD), Reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores arbitrarios (AP-PCR), Amplificación de secuencias intercaladas repetidas (ISSR), amplificación de huellas genéticas del DNA (DAF), Reacción de amplificación con un iniciador (SPARs), Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs), técnica usando en la longitud de fragmentos amplificados en combinación con AFLP (SAMPLE). La tercera categoría son las que utilizan la técnica de PCR. Uno de los ejemplos es la secuenciación de PCR, Electroforesis en gel con gradiente térmico (TGGE), Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE), Secuencia polimorfa amplificada y cortada (CAPS), Polimorfismo en la conformación de cadena sencilla (SSCP), Heteroduplex, Microsatélites con secuencia etiquetadas (STMS) (Karp, 1997).

El mejoramiento de plantas QPM utilizando un marcador de secuencia repetitiva inicia con la extracción del DNA de una planta. Los iniciadores que están en la región conteniendo los marcadores de secuencia repetitiva en el gen *Opaco2* son usados para amplificar las muestras utilizando el método de PCR. Cuando el número de secuencias repetitivas entre los iniciadores utilizados difiere de lo normal los alelos del *Opaco2* los fragmentos amplificados de DNA varían en tamaño. Se puede determinar si la planta posee dos copias del alelo normal, dos copias del alelo mutante *Opaco2* o una copia de cada alelo (Dreher, 2000).

Los microsatélites son locus altamente mutables y pueden estar presente en muchos sitios del genoma. Cada microsatélite puede ser único, si el locus del microsatélite se clona y secuencia. Los iniciadores que se utilicen pueden ser diseñadas para definir una secuencia específica del microsatélite (Beckman y Soller, 1990) (Karp, 1997).

Los microsatélites o secuencias simples repetitivas están dispersas por el genoma y consisten en secuencias de 2 a 35 pb de longitud. Muchos de estos generan patrones polimorficos los cuales son utilizados para caracterizar individuos o genotipos (Wenzel, 1992).

Una de las formas en que los marcadores moleculares pueden ayudar a los métodos convencionales de mejoramiento de la calidad de proteína es que puede utilizarse con muestras de DNA sacadas de tejido de plantas muy jóvenes, esto permite descartar plantas que no contengan el alelo mutante *Opaco2*, antes de la polinización, reduciendo el tamaño de la población y ahorrando tiempo y dinero. Otra forma de complementar las técnicas convencionales es que se puede distinguir entre plantas homocigotas recesivas que llevan dos copias del alelo mutante *Opaco2* y plantas heterocigotas que llevan solo una copia. Con esto los fitomejoradores no tienen que pasar por procesos laboriosos y costosos de descarte (Dreher, 2000).

La selección asistida por marcadores moleculares es una herramienta que analiza la diversidad genética. Por medio de los marcadores se puede seleccionar indirectamente rasgos interés. La selección en un nivel de DNA tiene diferentes ventajas comparadas con la selección fenotípica. Pueden evitar la propagación extensiva de progenie en rasgos con baja heredabilidad. En contraste con la expresión de genes al nivel fenotípico, los marcadores no son específicos de ciertos tejidos u órganos, ni dependen del estado de crecimiento. Con pocas cantidades pequeñas de tejido vegetal se puede obtener suficiente DNA para el análisis utilizando marcadores moleculares (Wenzel, 1992).

2.5 Conclusiones de la Revisión de Literatura

- 1- Los mexicanos basan su alimentación en maíz como grano básico.
- 2- En 1999 existía un casi 18% de niños menores de cinco años con desmendo.
- 3- La calidad nutricional se mide muchas veces en cantidad pero no en la calidad.
- 4- El endospermo del maíz tiene un 80 a 85% de proteína total donde su calidad es baja al tener un reducido contenido de aminoácidos esenciales. El embrión contiene un 20 a 25% de proteína de muy buena calidad. Por estas razones se debe considerar la mejora en la calidad nutritiva del maíz.
- 5- Las plantas QPM son las que recibieron el gen *Opaco2*, y además genes modificadores que cambian la textura del endospermo de harinoso a vitreo.
- 6- Los marcadores moleculares pueden ayudar a las técnicas de mejoramiento convencionales al permitir distinguir entre plantas normales con aquellas que contienen el gen *Opaco2*.

3. MATERIALES Y METODOS

Todo el trabajo de laboratorio se llevo a cabo en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Agronomía, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, situado en Marín, Nuevo León, México desde enero del 2002 hasta diciembre del 2002.

Los trabajos de campo como cruzamientos, toma de muestras de tejidos para generación de marcadores moleculares y de semillas y selección fenotípica se realizó por personal del Campo Experimental Río Bravo, INIFAP y no forma parte de este informe.

3.1 Material Genético

Este trabajo se desarrolló en las generación F2 de la crusa V537C X VS440. De cada mazorca se tomaron 8 granos y se sembraron en surcos. Una vez brotada la planta se tomó una hoja de ella y se extrajo el DNA. La variedad VS440 es una población que se comercializa ampliamente en el área noreste del país. Y la variedad V537C es una variedad QPM (Quality Protein Maize), es decir de alta calidad de proteína.

La población F2 se obtuvo de la siguiente manera: en el primer ciclo se sembraron plantas de las variedades V537C y VS440 siendo. Se espolvoreo el polen de la VS440 sobre los estilos y estigmas de la V537C.

En el segundo ciclo la semilla F1 de la crusa anterior se sembró y las plantas fueron autofecundadas.

En el tercer ciclo en febrero del 2001, la semilla de la autofecundación es sembrada produciendo tres tipo de plantas (normales, heterocigotas y homocigotas para el gen *Opaco2*). Estas plantas fueron las que se analizaron por marcadores, moleculares y se determinó el tipo de planta que eran. Si eran plantas normales o heterocigotas se desechaban. Si eran plantas homocigotas para el gen *Opaco2* recesivo se seleccionaron para retrocruzarce con VS440 o sea con su progenitor normal. La retrocurza tiene por objetivo recuperar las características del progenitor normal, y quedando el gen *Opaco2* presente. Las plantas aquí son F2 y contienen un 50% del genoma VS440 para recuperar casi todas las características del progenitor normal.

El material genético consistió de 504 plantas F₂ (63 familias con 8 plantas cada una) derivadas del cruzamiento entre la variedad VS440 y la variedad V537C como progenitor femenino. La variedad V537C es la donadora de la alta calidad de proteína siendo la que contiene el gen *Opaco2* recesivo. La variedad VS440 es una variedad comercial de maíz normal y de amplia aceptación en el noreste de México, en particular en la región sur de Tamaulipas.

Se utilizaron plantas para la extracción de DNA identificadas con su genotipo y el tipo de planta que son en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Identificación de las plantas utilizadas para la extracción de DNA.

Identificación	Fenotipo	Genotipo
33	Planta QPM	(CML173 X CML142) X CML186
24	Planta QPM	V537C
26	Planta normal	H368

3.2 Métodos de laboratorio

3.2.1 Extracción del DNA

Se obtuvo DNA a partir de hojas tiernas de las plantas de maíz, por el método de Doyle y Doyle (1990) modificado. Se utilizó el siguiente protocolo.

1- Se trituraron 0.2 gramos de tejido fresco en un tubo ependorf estéril de 1.5 ml. Se agregan 400 μ l de solución de extracción (CTAB) precalentada a 60°C (CTAB a una concentración de 2% p/v Tris- HCl 100mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, NaCl 1.4 M, polivinilpirrolidona 40,000 1% p/v). Previamente a la solución de extracción, se le agrega la cantidad requerida de β - mercaptoetanol para obtener la solución a una concentración final del 0.2 % se homogeniza la solución y se incuba durante 30 minutos a 60°C, mezclando ocasionalmente.

2- Al extracto se le agrega 1 volumen de cloroformo- alcohol isoamílico (24:1), se mezcla suave pero completamente y se centrifuga a 8,000 rpm durante 5 minutos. Se extrae la fase acuosa y se le agrega un volumen de la solución de precipitación (CTAB 1% p/v, Tris- HCl 50 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM pH 8.0) y se centrifuga por 5 minutos a 3,000 rpm.

3- El precipitado se resuspende en 100 μ l solución amortiguadora con alto contenido de sales (Tris- HCl 10mM pH 8.0, EDTA 0.1 mM pH 8.0, NaCl 1 M). El DNA se precipita adicionándole 0.7 vol. (2/3) de isopropanol frío, se mezclan por inversión y se centrifugan a 8,000 rpm durante 6 min. El precipitado se lava con 200 μ l de etanol al 80%, se centrifuga por 3 minutos a 8,000 rpm. Se seca y se resuspende en 30 μ l de solución amortiguadora TE.

3.2.2 Cuantificación del DNA

Se cuantifico el DNA utilizando un fluorimetro de la marca Hoefer modelo TKO 100 ($\lambda_{ex} = 365\text{nm}$ $\lambda_{em} = 460\text{ nm}$). En esta técnica se utiliza la solución Hoesch 33258 10 X TEN que contiene sus especificaciones en el Cuadro 1A (apéndice) y agua estéril en conjunto con la Solución de trabajo que contiene sus especificaciones en el Cuadro 2A.

Se constituyo una curva de calibración utilizando soluciones estándar con concentración de 100ng/ml, 200 ng/ml y 500ng/ml de DNA, utilizando DNA de pescado. Se tomo la cubeta y se le agregan 2ml de la solución de trabajo y 2 μl de DNA. Se colocó la cubeta en el fluorimetro y se anoto la lectura.

Se interpretaron los resultados de la fluorimetria utilizando análisis de regresión simple. La concentración ya medida en cada cantidad de DNA. Utilizando la formula de $Y_i = a + bX_i$ donde Y es la lectura del aparato X es la concentración de DNA con soluciones estándar establecidos, b es la pendiente de regresión y a es la interceptada de regresión.

3.2.3 Estandarización del DNA

El DNA se estandarizo utilizando la formula de $V_1C_1 = V_2C_2$. Utilizando esta formula calculo la concentración de DNA que necesito por la concentración que esta disponible en la solución. De esta forma se diluye a que todas las soluciones tengan la concentración de 10ng/ μl . El agua utilizada para diluir es agua destilada esterilizada o agua comercial para PCR.

3.2.4 Generación del marcador molecular ligado al gen *o2*

Se utilizo la técnica de PCR para generar el marcador molecular umc1066R y umc1066L, el cual esta localizado dentro del gen *opaco2*. Los iniciadores umc1066R contiene la secuencia 5' AGC AGC AGC AAC GTC TAT GAC ACT 3' y el segundo primer umc1066L con la secuencia 5' ATG GAG CAG GTC ATC TCA ATG G3'.

Cuadro 9. Componentes de la PCR tomando en cuenta una reacción.

Componentes	Una reacción
dNTPs	0.8 mM
Buffer de <i>Taq</i>	4.0 X
<i>Taq</i> polimerasa	0.1 U
MgCl ₂	3.2 mM
Glicerol	4.0 %
Marcador umc1066R	5.0 μM
Marcador umc1066F	5.0 μM
Agua Destilada	13μl
Total	16.4 μl
DNA molde/tubo	5.0 ng

La solución amortiguadora utilizada es la poly 10 x Buffer 1.2 ml del fabricante Promega.

La mezcla del Cuadro 9 se depositó en tubos de 250 μl previamente identificados. Una vez teniendo la mezcla en cada tubo se depositó el DNA molde en cada tubo.

Los tubos se colocaron en el termociclador con el siguiente programa térmico: paso1- Desnaturalización a 95° por 1 min., paso2- anillamiento 58° por 1 min, paso3- extensión 71° por 2 min, con 45 repeticiones desde el paso 1 al 3. Se utilizaron dos termocicladores: Minicycler modelo PTC- 150 de la marca MJ Research, y el segundo termociclador Gene Cyclor de la marca Bio- Rad, ambos con capacidad de 40 muestras.

3.2.6 Electroforesis

El DNA amplificado se tiñó con una solución amortiguadora de carga para cada solución estandarizada es el agregar el 10% del total de la solución.

Se utilizó electroforesis para separar los fragmentos de DNA amplificados en cada una de las muestras. Se hace un gel de agarosa al 1% utilizando media concentración de agarosa y media concentración de agarosa de alta resolución. El buffer utilizado fue TBE 0.5X. Se calienta en el microondas por 1 minuto a que el gel este fundido. Sacando el contenedor se le agrega Bromuro de Etidio a 1µg/ml concentración para teñir el DNA. Se vacía en el molde deseado previendo tener cinta o las pesas y los peines colocados en su lugar. Una vez endurecido el gel se retira la cinta y los peines. Se procede a colocar el molde en los tanques de electroforesis. Se utilizaron dos tanques: Electrophoretic gel system de la marca Maxi Gel y un tanque Gel- Pro de la marca Curtin Matheson Scientific Inc. ambos con capacidad de 80 muestras. Se le adicionó buffer TBE 0.5X las cantidades se describen en el cuadro 3A a cubrir el gel.

Se cargó cada muestra con micropipetas P20 en cada hueco dejado por el peine. En el primer carril se agregó el marcador molecular, luego en el segundo sigue el control negativo de ese grupo de reacciones, a continuación los progenitores empezando con el VS440 y luego el V537c. Esto para utilizarlos para interpretar los resultados en fotografía. Se utilizó una fuente de poder de la marca Buchler Instruments de 500 voltios. Se corrió a 100 volts por los primeros 10 minutos y luego se redujo a 60volts por una hora.

Como control de calidad se tomaba una muestra de cada 40 muestras y se pasaban por un mini gel de azarosa con la composición antes descrita. Esto para asegurar la calidad de los componentes, evitar posibles errores en el proceso y el funcionamiento del termociclador.

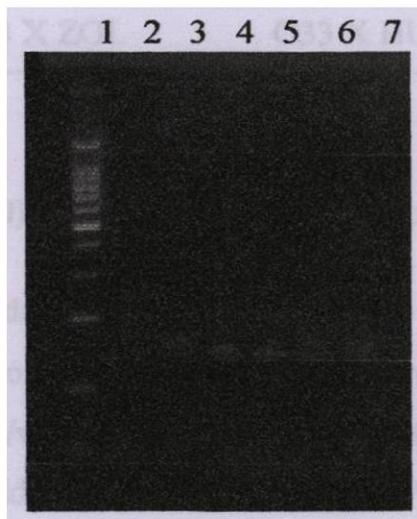
3.3 Método de Análisis de Resultados

3.3.1 Genotipificación de plantas F2

Los resultados fueron analizados al tomarse una fotografía sobre un transiluminador de luz ultravioleta (modelo Dual- Intensity) UVP, utilizando una cámara digital (Kodak DC 120) adaptada con un filtro para bromuro de etidio y luz ultravioleta (marca Kenko optical filter). Para analizar los datos de la fotografía se utilizó el programa Kodak Digital Science 1D.

Las bandas del microsatélite umc1066 aparecen entre la región de 100- 200. Cuando las bandas aparecen sobre los 200pb la planta es homocigótica para el alelo “normal” no adquirió el gen. Si existen dos bandas esta planta es heterocigota. Las plantas con una es la banda sencilla tendiendo hacia los 100pb, son homocigóticas para el gen *opaco2*.

Figura 1. Gel de agarosa con 7 carriles: 1- marcador molecular, 2 control negativo, 3- progenitor V537C, 4- progenitor V-440, 5- planta homocigota positiva 6- planta heterocigota y 7- planta homocigota negativa.



3.4 Comparación de Protocolos para la extracción de DNA

Dentro de esta investigación se de evaluaron tres métodos de extracción de DNA, con el propósito de determinar el método más económico y con mayor rendimiento. Los métodos probados fueron: Doyle y Doyle (1990), DNAzol®, y Hu y Quiroz. En este experimento se utilizaron dos plantas, una normal y otra homocigótica para el gen *opaco2*.

El diseño experimental utilizado fue el de completamente al azar con 4 repeticiones. Se utilizaron 2 genotipos por 3 métodos de extracción de DNA. Los 6 tratamientos son los de la Cuadro 10 con 4 repeticiones cada uno.

Cuadro 10. Tratamientos utilizados en el experimento de extracción.

Genotipo / Método	DNAzol®	HU y QUIROZ	Doyle y Doyle (1990)
Genotipo 24/ 26	G 24 x ZOL	G26 X HU	G26 X Doyle
Genotipo 33	G33 X ZOL	G33 X HU	G33 X Doyle

El método Doyle y Doyle (1990) Modificado se aplicó como sigue:

- 1- Se tritura 0.2 gramos de tejido fresco en un tubo ependorf estéril de 1.5 ml. Se agrega 400 µl de solución de extracción (CTAB) precalentada a 60°C (CTAB a una concentración de 2% p/v Tris- HCl 100mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, NaCl 1.4 M, polivinilpirrolidona 40,000 1% p/v). Previamente a la solución de extracción, se le agrega la cantidad requerida de β- mercaptoetanol para obtener la solución a una concentración final del 0.2 % se homogeniza la solución y se incuba durante 30 minutos a 60°C, mezclando ocasionalmente.
- 2- Al extracto se le agrega 1 volumen de cloroformo- alcohol isoamilico (24:1), se mezcla suave pero completamente y se centrifuga a 8,000 rpm durante 5 minutos. Se extrae la fase acuosa y se le agrega un volumen de la solución de precipitación (CTAB 1% p/v, Tris- HCl 50 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM pH 8.0) y se centrifuga por 5 minutos a 3,000 rpm.
- 3- El precipitado se resuspende en 100µl solución amortiguadora con alto contenido de sales (Tris- HCl 10mM pH 8.0, EDTA 0.1 mM pH 8.0, NaCl 1 M). El DNA se precipita adicionándole 0.7 vol. (2/3) de isopropanol frío, se mezclan por inversión y se centrifugan a 8,000 rpm durante 6 min. El precipitado se lava con 200 µl de etanol al

80%, se centrifuga por 3 minutos a 8,000 rpm. Se seca y se resuspende en 30 μ l de solución amortiguadora TE.

El método rápido mini genómico, basado en Hu y Quiros se aplicó de la siguiente manera:

- 1- Moler aproximadamente 0.15 gramos de tejido de hoja (o un disco cortado con la tapa de un tubo ependorf) en 250 μ l de buffer de extracción y mezclar. Las soluciones utilizadas en este método están descritas en el apéndice 4A.

Buffer de extracción

100mM Tris- HCl pH 8

50 mM EDTA pH 8

500 mM NaCl

1.25% SDS

- 2- Incubar a 65°C por 15 minutos
- 3- Agregar 200 μ l de acetato de potasio a 5 M. Refrigerar a 0°C por 10 minutos.
- 4- Centrifugar por 5 minutos. Transferir 600 μ l del sobrenadante a un tubo fresco.
- 5- Agregar 600 μ l de isopropanol. El DNA se precipita a la interfase.
- 6- Centrifugar en la centrifugadora por 15 minutos a 4°C en un pellet seco y resuspender en 500 μ l de buffer TE (10 mM Tris; 1 mM de EDTA) Agregar 1 μ l de RNase (10 mg/ml). Si es requerido agregar e incubar a temperatura ambiente por 20 minutos.

El método DNAzol® consistió en:

- 1- Pulverizar el tejido vegetal en nitrógeno líquido.
- 2- Colocar 0.15 gramos de tejido molido en un ependorf de 1.5ml. Agregar 450µl de DNAzol® y mezclar perfectamente (suavemente). Dejar reposar.
- 3- Agregar 450µl de cloroformo y mezcle vigorosamente por 20 segundos (no utilizar el vortex) Deje reposar por 5 min.
- 4- Centrifugar a 12,000g por 10 minutos.
- 5- Transfiera la fase acuosa superior (sobrenadante) a un ependorf nuevo y agregue un volumen igual de etanol y mezcle por inversión (10 veces). Deje reposar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- 6- Centrifugar 5,000g por 4 minutos y elimine el sobrenadante.
- 7- Resuspender el pellet de DNA con 100µl de EDTA (10mM)
- 8- Agregar 500µl de (DNAzol® + Etanol) solución lavadora y almacene por 5 minutos.
- 9- Centrifugar a 5000g por 4 minutos.
- 10- Decantar la solución lavadora y agregue 500µl de etanol 75%. Lave el pellet por 5 minutos por un proceso intermitente de vortex y centrifugación (5,000 x 4 minutos). Se debe repetir el lavado si se observan pigmentos.
- 11- Remueva el etanol por decantación y deje reposar los tubos colocándolos en forma invertida por 2 minutos. Elimine el exceso de etanol con una micropipeta.
- 12- Agregue 500µl de TE Buffer y disuelva el DNA, haciendo pasar la solución por la punta de la micropipeta.
- 13- Opcional. Centrifugar 12,000g por 4 minutos para remover material insoluble.
- 14- Opcional. Agregar 500µl de TE.

Los datos se analizaron utilizando análisis de varianza y para donde resulte significativa las diferencias entre los niveles de los factores en el método de extracción y genotipo o de la interacción de los anteriores se procedió a realizar una comparación de medias utilizando la técnica de DMS a un nivel de significancia del 5%.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Cuantificación del DNA de las plantas de la población F₂ V537C X VS440.

En el Cuadro 11 se presentan los resultados del proceso de extracción de DNA, el cual se expresa en términos de la concentración. En la parte final de este cuadro se puede observar que el promedio de rendimiento de DNA fue de 124.7 µg/ml, con un rango de 319 µg/ml, lo cual indica que el procedimiento de extracción utilizado produjo suficiente DNA para ser amplificado por PCR, como es el caso de la técnica de microsatélites. La variación de los rendimientos de DNA es tan amplia (de 0 a 319 µg/ml) que se puede concluir que este fue uno de los factores que impidieron la amplificación de algunas de las muestras (ver más adelante).

4.2. Segregación del locus *Opaco2* en la población F₂ V537C x VS440.

De las 496 muestras de DNA provenientes de plantas de la generación F₂ derivada del cruzamiento V537C x VS440 que crecieron en el Campo Experimental de Río Bravo del INIFAP durante el ciclo agrícola primavera verano 2002, un 29.43% no amplificó para el microsatélite umc1066.

En el Cuadro 12 se presenta la segregación de cada una de las familias F₂ para el gen *Opaco2*. Las plantas fueron clasificadas utilizando el marcador umc1066. De esta manera se detectó un 10% de plantas homocigóticas dominantes (O₂O₂), un 12% de plantas heterocigóticas (O₂o₂) y un 78% de plantas homocigóticas para el alelo *Opaco2* recesivo (o₂o₂). La segregación anterior no corresponde a una segregación (1/4 : 1/2 : 1/4), típica en el caso de un gen con dos alelos. La prueba de Chi-cuadrada confirmó la aseveración anterior ($\chi^2_{\text{CALCULADA}} = 520 > \chi^2_{(2 \text{ gl}, \alpha=0.05)}$). La distorsión en la segregación de la F₂ puede ser provocada por variabilidad de los progenitores para el locus *Opaco2*, ya que ambos son variedades de polinización abierta, por lo que pueden estar segregando para varios alelos de gen, y, además, la F₁ se obtuvo a partir de más de 300 cruzamientos entre plantas de los progenitores. Otra posible causa de la distorsión es el sistema de electroforesis utilizado, ya que a pesar de utilizar agarosa de alta resolución, la diferencia en el peso molecular de los alelos del marcador umc1066 es de alrededor de 10 pb, lo que dificulta la distinción entre plantas homocigóticas para alelos alternativos. Asimismo, cualquier factor selectivo, ya sea natural o artificial, que hubiera estado actuando sobre la población, habría distorsionado las frecuencias esperadas de los genotipos.

Las fotografías de los geles conteniendo el DNA de las plantas amplificadas se presentan en las Figuras 1A a la 13A, las cuales se encuentran en el apéndice.

Cuadro 11. Concentración del DNA ($\mu\text{g/ml}$) extraído de plantas F2 del cruzamiento V537C X VS440.

GENOTIPO	LECTURA	CONCENTRACION ESTIMADA	GENOTIPO	LECTURA	CONCENTRACION ESTIMADA
641-1	36	101	646-1	56	142
641-2	30	84	646-2	37	93
641-3	41	114	646-3	27	67
641-4	59	162	646-4	20	49
641-5	87	238	646-5	39	98
641-6	40	111	646-6	36	90
641-7	55	152	646-7	56	142
641-8	59	162	646-8	48	121
643-1	64	143	685-1	22	51
643-2	67	149	685-2	28	66
643-3	72	160	685-3	54	129
643-4	100	221	685-4	68	163
643-5	53	119	685-5	16	37
643-6	68	151	685-6	15	34
643-7	56	125	685-7	12	27
643-8	78	173	685-8	12	27
644-1	42	95	686-1	19	55
644-2	71	158	686-2	26	74
644-3	73	162	686-3	28	79
644-4	69	153	686-4	28	79
644-5	64	143	686-5	36	101
644-6	46	104	686-6	26	74
644-7	54	121	686-7	41	114
644-8	42	95	686-8	40	111
645-1	38	96	687-1	45	114
645-2	54	137	687-2	47	119
645-3	37	93	687-3	39	98
645-4	49	124	687-4	45	114
645-5	42	106	687-5	49	103
645-6	48	121	687-6	46	97
645-7	71	181	687-7	48	101
645-8	47	119	687-8	49	103

Cuadro 11. (Continuación) Concentración del DNA ($\mu\text{g/ml}$) extraído de plantas F2 del cruzamiento V537C X VS440.

GENOTIPO	LECTURA	CONCENTRACION ESTIMADA	GENOTIPO	LECTURA	CONCENTRACION ESTIMADA
688-1	23	46	695-2	71	158
688-2	37	77	695-3	63	140
688-3	41	86	695-4	68	151
688-4	27	55	695-5	56	125
688-5	38	79	695-6	56	125
688-6	37	77	695-7	44	99
688-7	34	70	695-8	23	54
688-8	23	46	699-1	43	90
689-1	59	132	699-2	30	61
689-2	88	195	699-3	22	44
689-3	30	69	699-4	21	41
689-4	58	130	699-5	25	50
689-5	95	210	699-6	53	112
689-6	77	171	699-7	35	72
689-7	97	214	699-8	28	57
689-8	68	163	706-1	55	123
690-1	42	117	706-2	55	123
690-2	59	162	706-3	91	201
690-3	36	101	706-4	74	164
690-4	78	213	706-5	91	201
690-5	48	133	706-6	85	188
690-6	59	162	706-7	85	188
690-7	41	114	706-8	84	186
690-8	29	82	735-1	44	105
692-1	40	87	735-2	65	156
692-2	2	0	735-3	49	117
692-3	2	0	735-4	24	56
692-4	20	40	735-5	38	90
692-5	35	76	735-6	23	54
692-6	46	102	735-7	34	80
692-7	41	90	735-8	38	90
692-8	26	54	742-1	60	128
695-1	75	166	742-2	87	188

Cuadro 11. (Continuación) Concentración del DNA ($\mu\text{g/ml}$) extraído de plantas F2 del cruzamiento V537C X VS440.

GENOTIPO	LECTURA	CONCENTRACION ESTIMADA	GENOTIPO	LECTURA	CONCENTRACION ESTIMADA
742-3	40	84	760-4	67	184
742-4	30	61	760-5	59	162
742-5	78	168	760-6	72	197
742-6	75	161	760-7	39	109
742-7	60	128	760-8	36	101
742-8	110	239	761-1	45	107
753-1	60	128	761-2	44	105
753-2	52	110	761-3	30	71
753-3	70	150	761-4	90	216
753-4	50	106	761-5	66	158
753-5	72	155	761-6	64	153
753-6	68	146	761-7	74	178
753-7	41	86	761-8	76	182
753-8	57	121	763-1	54	129
754-1	29	71	763-2	37	88
754-2	40	100	763-3	41	97
754-3	14	32	763-4	92	221
754-4	33	82	763-5	50	119
754-5	38	95	763-6	30	71
754-6	36	89	763-7	81	195
754-7	77	197	763-8	37	88
754-8	76	194	764-1	83	189
759-1	26	63	764-2	70	159
759-2	34	84	764-3	20	40
759-3	31	76	764-4	51	114
759-4	45	113	764-5	90	206
759-5	26	63	764-6	45	99
759-6	71	181	764-7	16	31
759-7	53	134	764-8	21	42
759-8	29	71	765-1	49	117
760-1	48	133	765-2	68	163
760-2	37	103	765-3	74	178
760-3	30	84	765-4	106	255

Cuadro 11. (Continuación) Concentración del DNA ($\mu\text{g/ml}$) extraído de plantas F2 del cruzamiento V537C X VS440.

GENOTIPO	LECTURA	CONCENTRACION ESTIMADA	GENOTIPO	LECTURA	CONCENTRACION ESTIMADA
765-5	81	195	774-7	53	112
765-6	66	158	774-8	33	68
765-7	72	173	776-1	9	14
765-8	88	212	776-2	15	28
766-1	63	151	776-3	30	64
766-2	67	161	776-4	40	87
766-3	65	156	776-5	41	90
766-4	95	229	776-6	31	66
766-5	60	143	776-7	45	99
766-6	112	270	776-8	17	33
766-7	57	136	777-1	42	88
766-8	135	326	777-2	43	90
767-2	80	192	777-3	45	95
767-3	42	100	777-4	32	66
767-4	63	151	777-5	42	88
767-5	57	136	777-6	94	203
767-6	51	122	777-7	34	70
767-7	61	146	777-8	24	48
767-8	44	105	778-1	60	152
768-1	38	90	778-2	60	152
768-2	72	173	778-3	50	126
768-3	71	170	778-4	46	116
768-4	72	173	778-5	48	122
768-5	42	82	778-6	37	95
768-6	28	16	778-7	51	130
768-7	49	115	778-8	43	110
768-8	47	105	779-1	57	128
774-1	43	90	779-2	49	109
774-2	42	88	779-3	19	38
774-3	82	177	779-4	6	7
774-4	38	79	779-5	60	135
774-5	34	70	779-6	37	80
774-6	62	132	779-7	39	85

Cuadro 11. (Continuación) Concentración del DNA ($\mu\text{g/ml}$) extraído de plantas F2 del cruzamiento V537C X VS440.

GENOTIPO	LECTURA	CONCENTRACION ESTIMADA	GENOTIPO	LECTURA	CONCENTRACION ESTIMADA
779-8	52	116	800-1	94	226
782-1	72	160	800-2	96	231
782-2	69	153	800-3	102	246
782-3	87	192	800-4	83	199
782-4	64	143	800-5	66	158
782-5	106	234	800-6	59	141
782-6	69	153	800-7	56	134
782-7	26	60	800-8	80	192
782-8	140	307	809-1	62	132
784-1	46	102	809-2	84	181
784-2	27	57	809-3	59	126
784-3	50	111	809-4	63	116
784-4	43	95	809-5	75	135
784-5	70	159	809-6	93	164
784-6	40	87	809-7	81	145
784-7	45	99	809-8	71	129
784-8	40	87	814-1	36	85
792-1	17	33	814-2	38	90
792-2	21	42	814-3	40	95
792-3	38	83	814-4	89	214
792-4	24	50	814-5	54	129
792-5	30	64	814-6	61	146
792-6	33	71	814-7	54	129
792-7	44	97	814-8	45	107
792-8	38	83	819-1	97	170
799-1	60	143	819-2	157	266
799-2	70	168	819-3	110	191
799-3	76	182	819-4	82	146
799-4	106	255	819-5	109	189
799-5	93	224	819-6	126	216
799-6	105	253	819-7	91	161
799-7	26	61	819-8	102	178
799-8	81	195	821-1	98	292

Cuadro 11. (Continuación) Concentración del DNA ($\mu\text{g/ml}$) extraído de plantas F2 del cruzamiento V537C X VS440.

GENOTIPO	LECTURA	CONCENTRACION ESTIMADA	GENOTIPO	LECTURA	CONCENTRACION ESTIMADA
821-2	22	63	830-4	47	99
821-3	47	138	830-5	31	64
821-4	30	87	830-6	41	86
821-5	52	153	830-7	58	123
821-6	31	90	830-8	31	64
821-7	48	141	832-4	62	183
821-8	30	87	832-5	84	250
825-1	32	66	832-6	29	84
825-2	39	81	832-7	37	108
825-3	43	90	832-8	58	171
825-5	52	110	835-1	73	162
825-6	29	59	835-2	55	123
825-7	49	103	835-3	47	106
825-8	29	59	835-4	18	43
828-1	109	240	835-5	41	93
828-2	132	290	835-6	55	123
828-3	97	214	835-7	56	125
828-4	97	214	835-8	77	171
828-5	145	318	837-1	28	73
828-6	82	182	837-2	59	149
828-7	69	153	837-3	42	107
828-8	21	50	837-4	62	157
829-1	49	110	837-5	50	127
829-2	61	136	837-6	42	107
829-3	94	208	837-7	35	90
829-4	40	91	837-8	60	152
829-5	66	147	838-1	50	138
829-6	81	179	838-2	42	117
829-7	91	201	838-3	48	133
829-8	69	153	838-4	47	130
830-1	83	179	838-5	40	111
830-2	42	88	838-6	5	8
830-3	6	8	838-7	28	69

Cuadro 11. (Continuación) Concentración del DNA ($\mu\text{g/ml}$) extraído de plantas F2 del cruzamiento V537C X VS440.

GENOTIPO	LECTURA	CONCENTRACION ESTIMADA	GENOTIPO	LECTURA	CONCENTRACION ESTIMADA
838-8	46	116	848-3	64	163
843-1	44	92	848-4	20	48
843-2	82	177	848-5	26	63
843-3	31	64	848-6	67	171
843-4	25	50	848-7	39	97
843-5	31	64	848-8	49	123
843-6	58	123	852-1	64	163
843-7	66	141	852-2	31	76
843-8	20	39	852-3	38	95
844-1	41	86	852-4	41	103
844-2	33	68	852-5	58	147
844-3	41	86	852-6	43	108
844-4	22	44	852-7	59	150
844-5	58	123	852-8	60	152
844-6	36	75	854-1	42	92
844-7	34	70	854-2	74	168
844-8	30	61	854-3	54	121
845-1	39	68	854-4	52	116
845-2	46	101	854-5	17	33
845-3	41	77	854-6	44	97
845-4	42	82	854-7	64	144
845-6	57	153	854-8	42	92
845-7	53	134	855-1	79	235
845-8	54	139	855-2	41	120
846-1	54	139	855-3	56	165
846-2	41	77	855-4	67	198
846-3	31	30	855-5	58	171
846-4	69	269	855-6	67	170
846-6	14	39	855-7	127	325
846-7	64	248	855-8	31	78
846-8	57	219	856-1	82	206
848-1	72	184	856-2	63	159
848-2	2	0	856-3	44	97

Cuadro 11. (Continuación) Concentración del DNA ($\mu\text{g/ml}$) extraído de plantas F2 del cruzamiento V537C X VS440.

GENOTIPO	LECTURA	CONCENTRACION ESTIMADA
856-4	67	151
856-5	66	149
856-6	67	151
856-7	52	116
856-8	86	196
866-1	68	163
866-2	59	141
866-3	43	102
866-4	88	212
866-5	68	163
866-6	76	182
866-7	61	146
866-8	47	112
867-1	97	170
867-2	81	145
867-3	94	165
867-4	77	138
867-5	72	130
867-6	125	215
867-7	29	62
867-8	93	164
868-1	54	137
868-2	59	150
868-3	56	142
868-4	55	139
868-5	114	294
868-6	82	210
868-7	72	184
868-8	58	147
869-1	36	89
869-2	37	92
869-3	23	55
869-4	18	42

GENOTIPO	LECTURA	CONCENTRACION ESTIMADA
869-5	47	118
869-6	33	82
869-7	46	116
869-8	44	110
	sumatoria	33621
	media	124.7
	rango	319

Cuadro 12. Familias que fueron amplificadas divididas por O_2O_2 (plantas normales), O_2o_2 (plantas heterocigotos) y o_2o_2 plantas homocigotas para el alelo *Opaco2* recesivo.

Familia	O_2O_2	O_2o_2	o_2o_2	No clasificadas
644	0	0	2	6
645	0	0	7	1
646	0	0	8	0
685	0	0	6	2
686	0	1	4	3
687	0	0	5	3
688	0	0	6	2
689	0	0	6	2
690	0	0	5	3
692	0	0	6	2
695	0	0	8	0
699	0	0	8	0
706	2	0	5	1
735	1	0	6	1
742	0	2	6	0
753	0	0	7	1
754	0	0	5	3
759	4	1	2	1
760	0	4	4	0
761	2	1	2	3
763	3	3	2	0
764	0	1	3	4
765	0	0	8	0
766	5	2	1	0
767	0	0	7	1
768	0	0	8	0
774	0	0	7	1
776	0	0	8	0
777	0	4	1	3
778	4	3	0	1
779	4	2	0	2
782	0	0	8	0
784	0	0	5	3
792	0	0	4	4
799	1	0	0	7
800	1	3	1	3
809	0	0	2	6

Cuadro 12. (Continuación) Familias que fueron amplificadas divididas por O_2O_2 (plantas normales), O_2o_2 (plantas heterocigotos) y o_2o_2 plantas homocigotas para el alelo *Opaco2* recesivo.

Familia	O_2O_2	O_2o_2	o_2o_2	No clasificadas
814	0	0	0	8
819	1	2	5	0
821	0	0	8	0
825	1	4	1	2
828	0	0	6	2
829	0	2	6	0
830	2	3	1	2
832	0	0	4	4
835	0	0	5	3
837	0	0	5	3
838	0	0	4	4
843	1	1	1	5
844	0	0	6	2
845	0	1	2	5
846	0	0	4	4
848	0	0	4	4
852	0	0	6	2
854	0	0	5	3
855	0	0	0	8
856	0	0	8	0
866	1	0	5	2
867	1	2	0	5
868	0	1	6	1
869	0	0	7	1
878	1	0	0	7
TOTAL	35	43	272	350
SEGREGACIÓN	0.1	0.1228	0.7771	1

4.3 Determinación de lisina y triptofano en plantas normales, heterocigotos y homocigotos para el alelo *Opaco2* .recesivo.

Se tomaron plantas al azar de la población F_2 y se enviaron a los Laboratorios de Calidad del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. En el Cuadro 13 se presentan los resultados del análisis químico para lisina y triptofano,

realizado en plantas de los tres genotipos (O_2O_2 , O_2o_2 y o_2o_2) determinados estos por medio del marcador umc1066.

En el Cuadro 13 se presentan los resultados del análisis químico para lisina y triptofano realizado con una muestra de plantas de los tres genotipos (O_2O_2 , O_2o_2 y o_2o_2) determinados estos por medio del marcador umc 1066.

En los Cuadros 14 al 17 se presentan los análisis de varianza para los contenidos de lisina y triptofano, tanto en el endospermo como en el grano. Se puede observar que sólo para el porcentaje de lisina en el endospermo hubo diferencias estadísticas entre los genotipos (Cuadro 14); aunque en el caso de la variable triptofano en el grano completo la probabilidad del valor F estuvo muy cerca de alcanzar la significación (Cuadro 17).

Al realizar la comparación de medias (Cuadro 18) se observó que el genotipo heterocigoto tuvo un mayor porcentaje de lisina en el endospermo y que el homocigoto recesivo fue el de menor contenido. Este resultado no era el esperado, ya que está reportado que la condición homocigótica recesiva para el gen *Opaco2* incrementa los niveles de lisina en el endospermo del grano del maíz (Poey, 1972). Sin embargo, al observar las medias para el contenido de lisina en el grano completo (Cuadro 18) destaca el homocigote recesivo con el mayor porcentaje (0.472) contra los contenidos del homocigote dominante (0.356) y el heterocigoto (0.446).

A pesar de que el análisis de varianza no resultó significativo para el contenido de triptófano en el grano completo (Cuadro 17), se realizó la comparación de medias entre genotipos (Cuadro 18), utilizando la prueba de la diferencia mínima significativa o DMS. Los resultados obtenidos indican que el genotipo homocigote recesivo (o_2o_2) produjo el mayor contenido de triptófano en el grano, siendo estadísticamente similar al heterocigote y superior al homocigote dominante. El mismo resultado se presentó en el caso del triptófano en el endospermo; sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas a pesar de que el homocigote recesivo tuvo cerca del doble (0.081%) de triptófano que los otros dos genotipos (0.036 y 0.044). Estos resultados concuerdan con lo esperado, de acuerdo al efecto del mutante *Opaco2*, el cual reduce el contenido de zeína en el endospermo, incrementando por lo tanto, la proporción de fracciones proteicas que tienen un mayor contenido de triptófano (Villegas, 1972).

Los resultados obtenidos en cuanto a los porcentajes de lisina y triptófano del genotipo homocigótico recesivo de *Opaco2*, tanto en grano completo como en endospermo, van de acuerdo a lo reportado por diversos autores (Cuadro 19) y sólo en el caso del contenido de lisina en el endospermo, los valores de los genotipos homocigote dominante y heterocigote (normales) son más altos que los reportados en la literatura.

Con excepción del contenido de lisina en el grano, la prueba de homogeneidad de varianzas (Cuadro 20) entre genotipos de maíz resultó significativa, lo que sugiere que los resultados obtenidos se utilicen con precaución. La heterogeneidad de varianzas tal vez fue provocada por el número tan desigual de observaciones de que se dispuso para cada genotipo (Cuadro 18).

Cuadro 13. Contenido de lisina y triptofano en el endospermo y el grano entero en una muestra de plantas de maíz de la población V537CXVS440 (Genotipo 1= O₂O₂; 2= O₂O₂; 3=O₂O₂)

Planta	Repetición	Lisina del Endospermo	Lisina del grano	Triptofano del Endospermo	Triptófano del grano	Genotipo
685-4	1	0.288	0.565	0.047	0.065	3
	2	0.288	0.539	0.48	0.069	3
761-3	1	0.298	0.539	0.044	0.071	3
	2	0.288	0.565	0.46	0.074	3
828-4	1	0.298	0.529	0.035	0.073	3
	2	0.298	0.539	0.035	0.071	3
768-7	1	0.288	0.489	0.038	0.069	3
	2	0.278	0.464	0.04	0.07	3
828-1	1	0.363	0.464	0.047	0.095	3
	2	0.363	0.484	0.048	0.095	3
846-3	1	0.278	0.539	0.029	0.061	3
	2	0.262	0.499	0.031	0.063	3
645-8	1	0.247	0.414	0.028	0.059	3
	2	0.237	0.414	0.031	0.061	3
706-2	1	0.237	0.378	0.027	0.058	3
	2	0.262	0.363	0.026	0.059	3
767-6	1	0.278	0.414	0.043	0.069	3
	2	0.288	0.439	0.043	0.069	3
838-3	1	0.237	0.388	0.04	0.061	3
	2	0.237	0.414	0.038	0.059	3
689-6	1	0.212	0.464	0.036	0.063	2
	2	0.237	0.489	0.036	0.065	2
761-1	1	0.288	0.449	0.036	0.061	2
	2	0.278	0.439	0.038	0.061	2
763-7	1	0.388	0.449	0.041	0.065	2
	2	0.363	0.464	0.041	0.063	2
763-8	1	0.313	0.489	0.046	0.063	2
	2	0.338	0.489	0.046	0.065	2
824-4	1	0.313	0.363	0.036	0.059	1
	2	0.338	0.348	0.036	0.059	1
830-8	1	0.338	0.038	0.036	0.059	2
	2	0.363	0.514	0.033	0.061	2
843-2	1	0.429	0.489	0.048	0.063	2
	2	0.429	0.514	0.048	0.065	2
845-7	1	0.429	0.514	0.05	0.069	2
	2	0.398	0.489	0.052	0.067	2
742-2	1	0.313	0.489	0.055	0.065	2
	2	0.338	0.479	0.057	0.067	2
777-1	1	0.429	0.398	0.044	0.057	2
	2	0.414	0.378	0.044	0.057	2

Cuadro 14. Análisis de varianza para el contenido de lisina en el endospermo

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Sig.
Genotipo	2	0.0456	0.0281	8.30**	0.001
Error	37	0.1020	0.0027		
Total corregido	39	0.1470			

$R^2 = 0.31$
**** = Altamente significativo**

Cuadro 15. Análisis de varianza para el contenido de lisina en el grano completo

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Sig.
Genotipo	2	0.0268	0.0134	1.76	0.186
Error	37	0.2820	0.0076		
Total corregido	39				

$R^2 = 0.087$

Cuadro 16. Análisis de varianza para el contenido de triptófano en el grano completo

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Sig.
Genotipo	2	0.0142	0.0071	0.775	0.468
Error	37	0.3390	0.0092		
Total corregido	39				

$R^2 = 0.040$

Cuadro 17. Análisis de varianza para el contenido de triptófano en el grano completo

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Sig.
Genotipo	2	0.00037	0.00018	3.063	0.059
Error	37	0.00225	0.00006		
Total corregido	39				

$R^2 = 0.142$

Cuadro 18. Comparación de medias para el contenido de lisina y triptófano en el endospermo y en grano (%).

Genotipo	n	Lisina en endospermo	Lisina en grano	Triptófano en endospermo	Triptófano en grano
1= O ₂ O ₂	2	0.325 ab	0.356 a	0.036 a	0.059 b
2= O ₂ O ₂	18	0.350 a	0.446 a	0.044 a	0.063 ab
3= o ₂ o ₂	20	0.281 b	0.472 a	0.081 a	0.069 a

Cuadro 19. Calidad de la proteína de maíz normal y QPM

	Lisina (%)		Triptófano (%)		Proteína(%)	
	Normal	QPM	Normal	QPM	Normal	QPM
Grano Entero						
Guimaraes <i>et al.</i> , (1994)	0.27	0.39	0.06	0.09	10.6	10.5
Endospermo						
Glover <i>et al.</i> , (1974)	0.138	0.347	0.026	0.079	11.6	10.1
Habben <i>et al.</i> , (1994)	0.21	0.37			12.7	9.9

Cuadro 20. Prueba de homogeneidad de varianzas entre genotipos de maíz para las variables asociadas a la calidad proteínica

Variable	Estadístico de Levene	Genotipos g.l.	Error g.l.	Significancia
Lisina en endospermo	5.165	2	37	0.011 *
Lisina en grano	0.583	2	37	0.563 ns
Triptófano en endospermo	4.499	2	37	0.018 *
Triptófano en grano	3.958	2	37	0.028 *

* = Significativo

ns = No significativo

En el Cuadro 21 se anotan las plantas homocigóticas para el alelo *Opaco2* recesivo de la población F2 (V537C x VS440), las cuales fueron utilizadas por el M.C. César Reyes Méndez, fitomejorador del INIFAP, para retrocruzarlas con el progenitor recurrente VS440.

Cuadro 21. Plantas homocigóticas para el alelo *Opaco2* recesivo (o_2o_2), de la población VS440 x V537C identificadas por medio del microsatélite umc 1066.

645-3	688-5	699-4	754-7	768-2	784-2	832-4	848-6	868-6
645-4	688-6	699-5	754-8	768-3	784-3	832-5	852-2	868-7
645-5	688-7	699-6	759-4	768-4	784-4	832-7	852-3	869-1
645-6	688-8	699-7	759-7	768-5	784-5	832-8	852-4	869-2
646-1	689-1	699-8	760-1	768-6	792-2	835-1	852-5	869-3
646-2	689-2	706-1	760-5	768-7	792-5	835-4	852-7	869-4
646-3	689-3	706-2	760-7	768-8	792-6	835-6	852-8	869-5
646-4	689-4	706-3	760-8	774-1	792-7	835-7	854-2	869-6
646-5	689-5	706-4	761-3	774-3	800-8	835-8	854-4	869-7
646-6	689-8	706-5	761-4	774-4	809-1	837-1	854-6	
685-1	690-2	735-1	763-3	774-5	809-3	837-3	854-7	
685-2	690-4	735-3	763-4	774-6	819-1	837-4	854-8	
685-3	690-6	735-5	764-1	774-7	819-2	837-5	856-1	
685-4	690-7	735-6	764-2	774-8	819-3	837-6	856-2	
685-5	690-8	735-7	764-4	776-1	819-4	838-1	856-3	
685-6	692-1	735-8	765-1	776-2	819-5	838-3	856-4	
685-7	692-4	742-1	765-2	776-3	821-1	838-7	856-5	
685-8	692-5	742-4	765-3	776-4	821-2	838-8	856-6	
686-2	692-6	742-5	765-4	776-5	821-3	843-6	856-8	
686-3	692-7	742-6	765-5	776-6	821-4	844-2	866-1	
686-4	692-8	742-7	765-6	776-7	821-5	844-3	866-3	
686-5	695-1	742-8	765-7	776-8	821-6	844-5	866-4	
686-6	695-2	753-1	765-8	777-5	821-7	844-6	866-5	
686-7	695-3	753-2	766-6	782-1	821-8	844-7	866-6	
687-1	695-4	753-3	767-2	782-2	825-1	844-8	867-6	
687-2	695-5	753-5	767-3	782-3	828-1	845-1	868-1	
687-4	695-6	753-6	767-4	782-4	828-3	845-3	868-2	
687-7	695-7	753-7	767-5	782-5	828-4	846-2	868-3	
687-8	695-8	753-8	767-6	782-6	828-5	846-3	868-4	

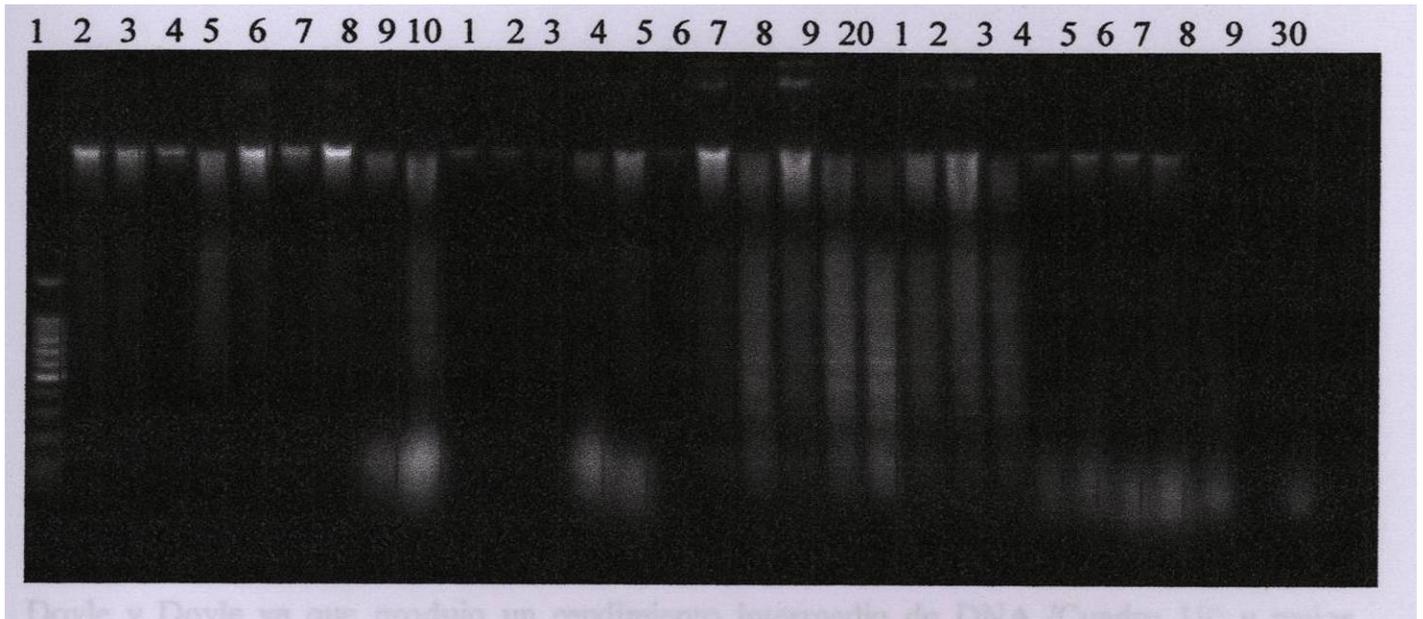
4.4 Métodos de extracción del DNA

La lectura del fluorímetro y la concentración estimada del DNA de cada tratamiento, se presenta en el Cuadro 22. Además, las muestras se sometieron a electroforesis en geles de agarosa para confirmar las estimaciones de la concentración y determinar la calidad del DNA. La calidad del DNA se estimó como la integridad de la molécula de DNA. A este respecto, un barrido brillante en la parte superior del carril se interpretó como un DNA abundante y de muy buena calidad. Las muestras que produjeron un barrido brillante a lo largo del carril, se clasificaron como conteniendo DNA abundante, pero de baja calidad; esto se atribuye a que el procedimiento de extracción rompió las cadenas de DNA en pedazos de varios tamaños. Los carriles poco brillantes se interpretaron como tratamientos que produjeron DNA de baja concentración. Obviamente, los carriles vacíos indican que el protocolo de extracción no logró aislar DNA a partir de la muestra de tejido utilizada. En la Figura 2 se presenta el resultado de este experimento con su interpretación.

Cuadro 22. Concentración de la solución de DNA extraído de una planta normal (33) y una QPM (26) estimada en $\mu\text{g/ml}$ de DNA.

Método de Extracción	Genotipo	Repetición			
		I	II	III	IV
Doyle y Doyle	33	54	48	42	23
	26	120	84	66	102
Hu & Quiros	33	0	60	11	102
	26	11	5	60	36
DNAzol ®	33	66	102	162	211
	24	150	96	271	108

Figura 2. Fotografía después de 1 hr de electroforesis a 100volts del gel /1% de azarosa) conteniendo DNA obtenido por los métodos de extracción probados.



En el Figura 2, se puede apreciar la calidad del DNA obtenido con los tres métodos de extracción probados. En el carril 1, se encuentra el marcador molecular, en los carriles 2, 3, 4, 6, 7 y 8 se observa DNA de muy buena calidad obtenido del método de Doyle y Doyle. En el carril 5 encontramos un barrido por el método Doyle y Doyle. El barrido es luminosidad causada por partes del DNA que fue fragmentado.

El método de Hu y Quiroz produjo resultados muy variables en la calidad del DNA obtenido entre una planta y otra. En los carriles 9 y 14 se encuentra DNA de buena calidad y cantidad. En los carriles 10 y 15 se encuentran mucho DNA, pero de muy mala calidad. Finalmente, en los carriles 11, 12, 13, 14 y 16 se encuentran muy poco DNA.

El método de DNAzol® produjo resultados homogéneos, siendo que todos los carriles de este barrieron casi de la misma forma. Los carriles 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24. se encuentran con el DNA distribuido a lo largo de todo el carril por lo que se puede concluir que existe mucho DNA pero de muy baja calidad.

En función de los resultados obtenidos se puede concluir que el mejor método es el Doyle y Doyle ya que produjo un rendimiento intermedio de DNA /Cuadro 19) y mejor calidad (Figura2). El método de DNAzol® es el que dio la mayor cantidad de DNA pero de muy baja calidad. El método con mayor heterogeneidad fue el de Hu y Quiroz el cual tuvo mucha variación entre plantas.

En función de los resultados obtenidos para la concentración y la calidad del DNA obtenido se concluye que el mejor método es el de Doyle y Doyle, ya que produjo un rendimiento intermedio de DNA (Cuadro 24) y mejor calidad (Figura 2). El método de DNAzol® fue el que produjo la mayor cantidad de DNA, aunque de muy baja calidad. El método de Hu y Quiroz produjo resultados variables al considerar diferentes plantas.

Cuadro 23. Análisis de varianza para la concentración de la solución de DNA ($\mu\text{g/ml}$) obtenida con tres métodos de extracción.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F cal	P(F)
Método de extracción	2	44168.58	22084.29	12.75**	0.000
Genotipo	1	1176.00	1176.00	0.68	0.421
Método * Genotipo	2	4614.25	2307.12	1.33	0.289
Error	18	31159.00	1731.06		
Total	23	81117.83			

** Altamente significativa

Cuadro 24. Media, error estándar e intervalo de confianza de la concentración del DNA producido por los métodos de extracción probados.

Método	Media ($\mu\text{g/ml}$)	Error Estándar	Intervalo de Confianza del 95%	
			Limite inferior	Limite superior
DNAzol	138.25 a*	14.71	107.346	169.154
Doyle y Doyle	67.38 b	14.71	36.471	98.279
Hu & Quiroz	35.63 b	14.71	4.721	66.529

*Letras iguales indican igualdad estadística

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos y la literatura consultada se deducen las conclusiones siguientes:

1. Se identificaron plantas F_2 provenientes del cruzamiento V537C x VS440, conteniendo el gen *Opaco2* en condición homocigótica recesiva por medio del tipo microsatélite umc1066.
2. El método de extracción de Doyle y Doyle produjo el DNA de la mejor calidad y con una concentración intermedia cuando se aplicó en maíz QPM y normal.
3. La variación de los rendimientos de DNA obtenido de las plantas de la población F_2 (V537C x VS440) fue de 0 a 319 $\mu\text{g/ml}$, lo que impidió la amplificación de algunas de las muestras.
4. La segregación del gen *Opaco2* en la población F_2 fue 10% de plantas homocigóticas dominantes (O_2O_2), un 12% de heterocigóticas (O_2o_2) y un 78% de homocigóticas recesivas (o_2o_2), la cuál no corresponde al caso de un gen con dos alelos.
5. Los resultados obtenidos para los porcentajes de lisina y triptófano en el genotipo homocigótico recesivo de *Opaco2*, tanto en grano completo como en endospermo, van de acuerdo a lo reportado por la literatura, con la excepción de la lisina en el endospermo.

Bibliografía

Bjarnason, M. 1992. Breeding of quality protein maize (QPM). México, D.F. p182, 183

Chavez, A. 1972. El maíz en la nutrición de México, Simposium sobre desarrollo y utilización de maíces de alto valor nutritivo. Chapingo, México. P 9- 12

Doyle JJ, Doyle J.L.1990. Isolation of plant DNA from plant tissue. Focus 12:13-15

Dreher,K. 2000.In marker-asisted selection cost- efective compared to convencional plant breeding methods? The case of quality protein maize. Ravello, Italia. 25p

Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia.2002. Para financiar el desarrollo hay que invertir en los niños y las niñas. Nueva York, EUA. P. 1- 5

Glover D. V., P.L. Crane, P.S. Misra y E.T. Mertz. 1975. La genética de los mutantes del endospermo de maíz en relación con calidad de proteína. En: maíz de calidad proteínica. compendio de las ponencias presentadas en el simposio Internacional CIMMYT- PURDUE. L. F. Barman y E. T. Mertz (Edts). Limusa. México Pag. 245- 257.

Guimaraes P.E.O., M.A. Lopez, E. E.G. Gama, M. X. Santos, S. N. Parentoni, M. C.D.

Paes, P.A. Vieira Junior, A.E. Silva, E. Paiva, L.A. Correa, asn C.A. Pacheco. 1994.

Quality protein maize improvement at the national maize and sorghum research Center CNPM/EMBRAPA/BRAZIL. In: Quality Protein Maize: 1964- 1994. Proceedings of the International Symposium on Quality Protein Maize. Brian A. Larkins and Edwin T. Mertz (eds). P 185- 203. EMBRAPA/CNPMS, Sete Lagoas, MG, Brazil.

Graner, A. 1992. Towards an understanding of the genome- New molecular markers increase the efficiency of plant breeding. Agro- Food- Industry Hi- Tech. Grünbach, Alemania. P. 18- 23

Habben, J. E., G. L. Moro, B. G. Hunter, B.R. Hamaker, and B.A. Larkins. 1994. Characterization of the proteins that Define the Nutritional Quality of Maize Endosperm. In: Quality Protein Maize: 1964- 1994. Proceedings of the International Symposium on Quality Protein Maize. Brian A. Larkins and Edwin T. Mertz (eds). P 121- 132. EMBRAPA/CNPMS, Sete lagoas, MG, Brazil

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 2001. El sector alimentario en México. México. 311p

Jugenheimer, R. 1981. Maíz variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semillas, Limusa, México. 841p

Paes, A. 1973. Protein quality and kernel properties of modified opaque-2 endosperm corn involving a recessive allele at the sugary-2 locus. Crop Science. P 633

Poey, F. 1972. Mejoramiento genético de la calidad nutritiva del maíz, Simposium sobre desarrollo y utilización de maíces de alto valor nutritivo, Chapingo, México. P69-72

Poey, F. 1977. Producción comercial del maíz de alta calidad proteínica: Asuntos y problemas actuales, maíz de alta calidad proteínica, CIMMYT- PURDUE, México p 271

Reyes, P. 1990. El maíz y su cultivo. AGT. México. 460p

Tanksley, S. 1983. Molecular markers in plant breeding. Plant molecular biology reporter. Estados Unidos, Pp. 3-7.

Vasal, S. 1993. Heterosis and combining ability of CIMMYT's quality protein maize germoplasm; 1, Crop Science, Vol 33, January- February. P 46

Villegas, E. 1972. Maíces de alta calidad nutricional, Simposium sobre desarrollo y utilización de maíces de alto valor nutritivo, Chapingo, México. P 13- 18

Wenzel, A. Graner, 1992. Towards an understanding of the genome- New molecular markers increase the efficiency of plant breeding, Grünbach, Germany. In Agro-food- industry Hi- Tech. p. 20- 21

Wessel- Beaver, L. 1982. Genetic control of modified endosperm texture in opaque- 2 maize. Crop Science. Illinois, Estados Unidos. p 1095

Wessel- Beaver, L.1995. Genetic Variability and Correlations in a modifies endosperm texture Opaque2 maize population. Illinois, Estados Unidos p129

APENDICE

Cuadros

Cuadro 1A. Preparación de la solución de Hoesch.

Solución de trabajo	50 ml	100 ml	200ml
1mg/ml DYE STOCK	10 μ l	20 μ l	40 μ l
10 X TEN	5 ml	10ml	20ml
Agua Estéril	45 ml	90ml	180ml

Cuadro 2A. Solución TEN

0.1 M NaCl	58.44
10 mM TRIS Cl (pH =8)	121.1
1 mM EDTA (pH = 8)	372.24

Cuadro 3A. Solución de trabajo TBE al 0.5

0.045m	TRIS- Borate
0.001m	EDTA

Cuadro 4A. Preparación de soluciones para el método de Hu y Quiroz

Solución	Preparación
Tris (PM121) 1M	6 gr /50 ml pH 8
EDTA 0.5 M pH 8.0	Cada 100 ml:
Na ₂ EDTA 2H ₂ O (PM 372)	18.6 gramos
H ₂ O	Resto
NaOH 10 M	5 ml
25 ml de Solución de extracción	
CTAB 2%	0.5 gramos
Tris- HCl 100mM pH 8	2.5 ml Tris- HCl 1 M
EDTA 20 mM pH 8	1 ml EDTA 0.5 M
NaCl 1.4 M	2 gramos
PVP 40,000 1%	0.25 gramos
β- mercaptoetanol 0.2%	50 μl
25ml de Solución de precipitación	
CTAB 1%	0.25 gramos
Tris- HCl 50 mM pH 8	1.25 ml Tris- HCl 1 M
EDTA 10 mM pH 8	0.5 ml EDTA 0.5M
25 ml de Solución salina	
Tris- HCl 10 mM pH 8	250 μl Tris- HCl 1 M
EDTA 0.1 mM pH 8	25 μl EDTA 0.1 M
NaCl 1 M	1.46 gramos

FIGURAS DEL APENDICE

Figura 1 - Gel 1

1 2 3 4

40



1: 100-500 pb	8: 706-2	15: 735-1	22: 735-7	29: 692-2	36: 695-1
2: control (-)	9: 706-3	16: 735-2	23: 735-8	30: 692-3	37: 695-2
3: V537C	10: 706-4	17: 735-3	24: 760-1	31: 692-4	38: 695-3
4: V 440	11: 706-5	18: 735-4	25: 760-2	32: 692-5	39: 695-4
5: 699-7	12: 706-6	19: 735-5	26: 760-3	33: 692-6	40: 695-5
6: 699-8	13: 706-7	20: 735-6	27: 760-4	34: 692-7	
7: 706-1	14: 706-8	21: 100-500 pb	28: 692-1	35: 692-8	

Figura 2 - Gel 2

1 2 3 4

40



1: 100-500 pb	8: 699-1	15: 706-1	22: 706-7	29: 735-6	36: 754-7
2: control (-)	9: 699-2	16: 706-2	23: 706-8	30: 735-7	37: 754-8
3: V537C	10: 699-3	17: 706-3	24: 735-1	31: 735-8	38: 759-1
4: V 440	11: 699-4	18: 706-4	25: 735-2	32: 760-1	39: 759-2
5: 695-6	12: 699-6	19: 706-5	26: 735-3	33: 760-2	40: 759-4
6: 695-7	13: 699-7	20: 706-6	27: 735-4	34: 760-3	
7: 695-8	14: 699-8	21: 100-500 pb	28: 735-5	35: 760-4	

Figura 3 - Gel 3

1 2 3

40

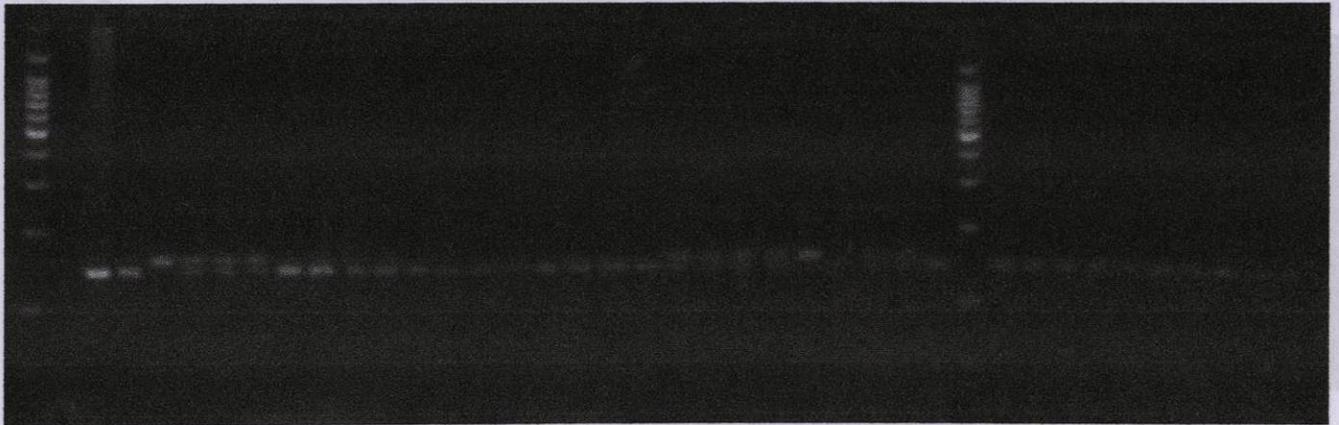


1: 100-500 pb	8: 759-8	15: 761-7	22: 742-1	29: 742-8	36: 753-6
2: control (-)	9: 761-1	16: 761-8	23: 742-2	30: 699-5	37: 753-7
3: V537C	10: 761-2	17: 763-1	24: 742-3	31: 753-1	38: 753-8
4: V 440	11: 761-3	18: 763-2	25: 742-4	32: 753-2	39: 754-1
5: 759-5	12: 761-4	19: 763-3	26: 742-5	33: 753-3	40: 754-2
6: 759-6	13: 761-5	20: 763-4	27: 742-6	34: 753-4	
7: 759-7	14: 761-6	21: 100-500 pb	28: 742-7	35: 753-5	

Figura 4 - Gel 4

1 2 3

40

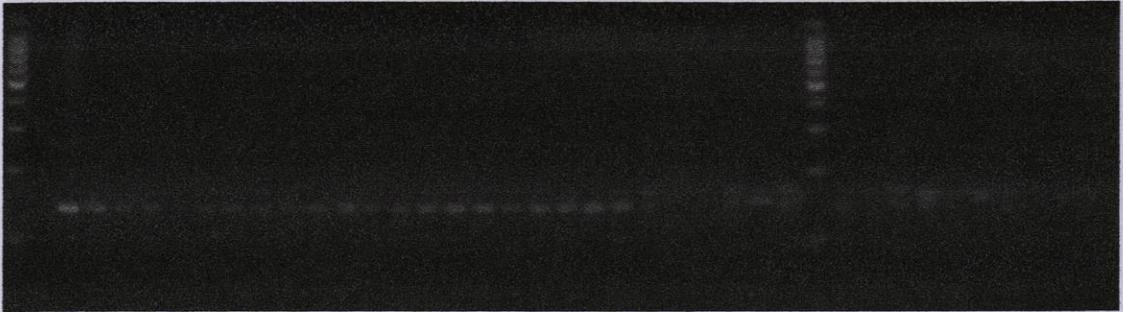


1: 100-500 pb	8: 763-8	15: 765-3	22: 766-2	29: 767-2	36: 767-8
2: control (-)	9: 764-1	16: 765-4	23: 766-3	30: 100-500 pb	37: 768-1
3: V537C	10: 764-2	17: 765-5	24: 766-4	31: 767-3	38: 768-2
4: V 440	11: 764-4	18: 765-6	25: 766-5	32: 767-4	39: 768-3
5: 763-5	12: 764-6	19: 765-7	26: 766-6	33: 767-5	40: 768-4
6: 763-6	13: 765-1	20: 765-8	27: 766-7	34: 767-6	
7: 763-7	14: 765-2	21: 766-1	28: 766-8	35: 767-7	

Figura 5 - Gel 5

1 2 3

40



1: 100-500 pb	8: 768-8	15: 774-8	22: 776-7	29: 777-6	36: 778-3
2: control (-)	9: 774-3	16: 776-1	23: 776-8	30: 100-500 pb	37: 778-4
3: V537C	10: 774-4	17: 776-2	24: 777-1	31: 784-1	38: 775-5
4: V 440	11: 774-5	18: 776-3	25: 777-2	32: 777-7	39: 778-7
5: 768-5	12: 774-1	19: 776-4	26: 777-3	33: 777-8	40: 778-8
6: 768-6	13: 774-6	20: 776-5	27: 777-4	34: 778-1	
7: 768-7	14: 774-7	21: 776-6	28: 777-5	35: 778-2	

Figura 6 - Gel 6

1 2 3

40



1: 100-500 pb	8: 779-5	15: 782-4	22: 784-3	29: 792-2	36: 799-1
2: control (-)	9: 779-6	16: 782-5	23: 784-4	30: 100-500 pb	37: 799-2
3: V537C	10: 779-7	17: 782-6	24: 784-5	31: 792-4	38: 799-3
4: V 440	11: 779-8	18: 782-7	25: 784-6	32: 792-5	39: 799-4
5: 779-2	12: 782-1	19: 782-8	26: 784-7	33: 792-6	40: 799-5
6: 779-3	13: 782-2	20: 779-1	27: 784-8	34: 792-7	
7: 779-4	14: 782-3	21: 784-2	28: 792-1	35: 792-8	

Figura 7 - Gel 7

1 2 3

40



1: 100-500 pb	8: 800-1	15: 800-8	22: 814-3	29: 819-2	36: 821-1
2: control (-)	9: 800-2	16: 809-1	23: 814-4	30: 819-3	37: 821-2
3: V537C	10: 800-3	17: 809-2	24: 814-5	31: 819-4	38: 821-3
4: V 440	11: 800-4	18: 809-3	25: 814-6	32: 819-5	39: 821-4
5: 799-6	12: 800-5	19: 814-1	26: 814-7	33: 819-6	40: 821-5
6: 799-7	13: 800-6	20: 100-500 pb	27: 814-8	34: 819-7	
7: 799-8	14: 800-7	21: 814-2	28: 819-1	35: 819-8	

Figura 8 - Gel 8

1 2 3

40



1: 100-500 pb	8: 825-1	15: 828-2	22: 828-8	29: 829-7	36: 830-8
2: control (-)	9: 825-3	16: 828-3	23: 829-1	30: 829-8	37: 832-4
3: V537C	10: 825-5	17: 828-4	24: 829-2	31: 830-1	38: 832-5
4: V 440	11: 825-6	18: 828-5	25: 829-3	32: 830-2	39: 832-6
5: 821-6	12: 825-7	19: 828-6	26: 829-4	33: 830-4	40: 832-7
6: 821-7	13: 825-8	20: 100-500 pb	27: 829-5	34: 830-5	
7: 821-8	14: 828-1	21: 828-7	28: 829-6	35: 830-7	

Figura 9 - Gel 9

1 2 3

40

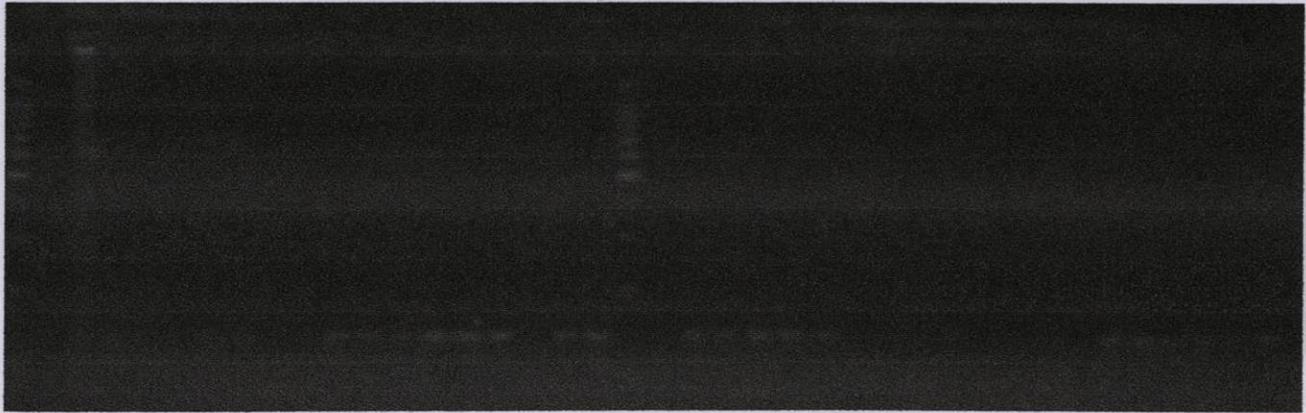


1: 100-500 pb	8: 835-3	15: 837-3	22: 843-2	29: 844-3	36: 845-2
2: control (-)	9: 835-4	16: 837-4	23: 843-3	30: 844-4	37: 845-3
3: V537C	10: 835-5	17: 837-5	24: 843-4	31: 844-5	38: 845-4
4: V 440	11: 835-6	18: 837-6	25: 843-5	32: 844-6	39: 845-6
5: 832-8	12: 835-7	19: 837-7	26: 843-6	33: 844-7	40: 845-7
6: 835-1	13: 835-8	20: 100-500 pb	27: 843-8	34: 844-8	
7: 835-2	14: 837-1	21: 843-1	28: 844-2	35: 845-1	

Figura 10- Gel 10

1 2 3

40



1: 100-500 pb	8: 846-3	15: 852-4	22: 854-2	29: 855-3	36: 856-2
2: control (-)	9: 846-4	16: 852-5	23: 854-4	30: 855-4	37: 856-3
3: V537C	10: 846-6	17: 852-6	24: 854-6	31: 855-5	38: 856-4
4: V 440	11: 846-7	18: 852-7	25: 854-7	32: 855-6	39: 856-5
5: 845-8	12: 846-8	19: 852-8	26: 854-8	33: 855-7	40: 856-6
6: 846-1	13: 852-2	20: 100-500 pb	27: 855-1	34: 855-8	
7: 846-2	14: 852-3	21: 854-1	28: 855-2	35: 856-1	

Figura 11 - Gel 11

1 2 3

40



1: 100-500 pb	8: 866-3	15: 867-3	22: 644-6	29: 645-7	36: 646-6
2: control (-)	9: 866-4	16: 867-4	23: 645-1	30: 645-8	37: 646-7
3: V537C	10: 866-6	17: 867-5	24: 645-2	31: 646-1	38: 646-8
4: V 440	11: 866-7	18: 867-6	25: 645-3	32: 646-2	39: 685-1
5: 856-8	12: 866-8	19: 867-7	26: 645-4	33: 646-3	40: 685-2
6: 866-1	13: 867-1	20: 100-500 pb	27: 645-5	34: 646-4	
7: 866-2	14: 867-2	21: 644-4	28: 645-6	35: 646-5	

Figura 12 - Gel 12

1 2 3

40



1: 100-500 pb	8: 685-6	15: 686-5	22: 687-3	29: 688-3	36: 760-5
2: control (-)	9: 685-7	16: 686-6	23: 687-4	30: 688-4	37: 838-1
3: V537C	10: 685-8	17: 686-7	24: 687-5	31: 754-4	38: 838-2
4: V 440	11: 686-1	18: 686-8	25: 687-7	32: 754-5	39: 838-3
5: 685-3	12: 686-2	19: 687-1	26: 687-8	33: 760-6	40: 754-6
6: 685-4	13: 686-3	20: 100-500 pb	27: 688-1	34: 760-7	
6: 685-5	14: 686-4	21: 687-2	28: 688-2	35: 760-8	

Figura 13 - Gel 13

1 2 3



- | | | | | | |
|----------------|-----------|----------------|-----------|-----------|-----------|
| 1: 100-500 pb | 8: 688-8 | 15: 689-7 | 22: 690-5 | 29: 868-2 | 36: 848-1 |
| 2: control (-) | 9: 689-1 | 16: 689-8 | 23: 690-6 | 30: 868-3 | 37: 848-4 |
| 3: V537C | 10: 689-2 | 17: 690-1 | 24: 690-7 | 31: 868-4 | 38: 848-6 |
| 4: V 440 | 11: 689-3 | 18: 690-2 | 25: 690-8 | 32: 868-5 | 39: 848-7 |
| 5: 688-5 | 12: 689-4 | 19: 690-3 | 26: 777-4 | 33: 868-6 | 40: 848-8 |
| 6: 688-6 | 13: 689-5 | 20: 100-500 pb | 27: 792-3 | 34: 868-7 | |
| 7: 688-7 | 14: 689-6 | 21: 690-4 | 28: 868-1 | 35: 868-8 | |

