

### ENVEJECIMIENTO ACELERADO DE SEMILLAS DE MAÍZ AZUL Y SU ANÁLISIS MOLECULAR MEDIANTE RAPD

Dagoberto Durán Hernández, Marina Olivia Franco Hernández, Germán Fernando Gutiérrez Hernández\*

Departamento de Bioprocesos, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI), Instituto Politécnico Nacional, Av. Acueducto s/n, La Laguna Ticomán. 07340 México, D. F. Tel. 5729 6000 ext. 56343. ggutierrez@acei.upibi.ipn.mx

Palabras clave: *Maíz azul, envejecimiento artificial, RAPD, huella genómica.*

**Introducción.** En las últimas dos décadas se han utilizado con éxito herramientas moleculares para analizar el ADN para caracterizar y así distinguir especies, razas, variedades, cultivares e individuos (1,2,3). Entre las más destacadas está la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite amplificar *in vitro* y de manera exponencial fragmentos aleatorios o específicos de ADN a partir de un genoma empleado como molde (4,5,3).

El trabajo tiene la finalidad de evaluar los daños ocasionados a nivel molecular por el envejecimiento artificial de 4 variedades criollas de maíz azul (Cocotillán, Cuijingo, Puebla-479 y Oaxaca-711).

**Metodología.** Las semillas fueron sometidas a dos modalidades de envejecimiento: calor húmedo (41 °C, 100 % h. r., durante 72 h) y calor seco (60 °C, por 48 h), se generaron 12 tratamientos.

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de los ejes embrionarios de las semillas de maíz. Se utilizó el método modificado de Dellaporta (1983) para la extracción del ADN, al cual se le determinó su pureza por medio de la absorbancia a la luz ultravioleta y, se calculó su concentración inicial para cada tratamiento. Para la selección de los iniciadores arbitrarios a emplear en la RAPD, se realizó un barrido con la finalidad de detectar aquellos iniciadores que pudieran amplificar segmentos de ADN a las temperaturas de alineamiento de 40, 48 y 35 °C. Estas temperaturas son usadas comúnmente por iniciadores complementarios microsatélite como (GATA)<sub>4</sub> y (GACA)<sub>4</sub>. Solo 1 iniciador (E14) amplificó segmentos de ADN para dichas temperaturas, por lo cual fue seleccionado, complementando con los iniciadores E09, E10, E11, E16, E17, y G15, que amplificaron a 35°C y se complementó con los iniciadores E12 y E13 que presentaron amplificación y bandas bien definidas a 40 °C.

**Resultados y discusión.** Mediante la RAPD se analizó el ADN de los 12 tratamientos y se obtuvieron las huellas genómicas resultantes de la combinación de cada iniciador con los tratamientos. Se detectaron un total de 63 bandas con diferentes pesos moleculares de entre 370 y 2923 pb. Del total de bandas obtenidas solo 2 fueron monomórficas, es decir, que estuvieron presentes en todos los tratamientos, esto significa que los patrones de bandas RAPDs obtenidos a partir de cada iniciador fueron distintos entre sí. De esta manera el 96.8% de las bandas detectadas fueron polimórficas y el 50.8 % se obtuvo con los iniciadores E-09, E-14 y G-15. El iniciador G-15 fue el más informativo al detectar 11 bandas de ADN las cuales en su totalidad mostraron polimorfismo. En el análisis molecular llevado a cabo se encontraron diferencias en los fragmentos obtenidos bajo las condiciones de envejecimiento artificial. Esto sugiere por el análisis de los fragmentos que la RAPD fue sensible al deterioro artificial de las semillas. Esto se puede verificar al observar la Figura 1 donde se advierte que la RAPD fue capaz de diferenciar los daños a nivel de ADN, ya que las distancias de los grupos

formados en el dendograma para las tres condiciones de un mismo genotipo ocupan ramas distintas. Esto constata la utilidad de la RAPD para distinguir semillas con diferente grado de envejecimiento.

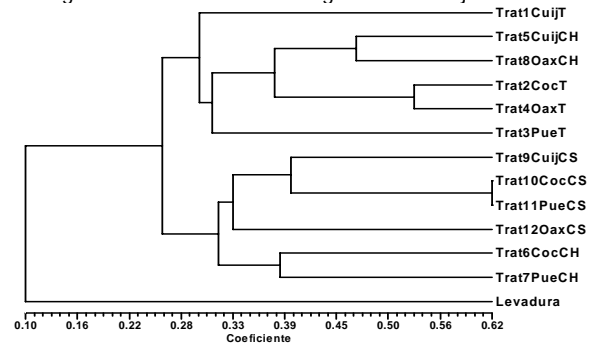


Figura 1. Dendograma que muestra la relación genómica de cuatro genotipos de maíz azul con sus tratamientos

**Conclusiones y perspectivas.** Se obtuvieron las huellas genómicas específicas para cada genotipo de maíz azul, así como para cada condición de envejecimiento de las semillas. La comparación de las distancias de los grupos formados en los dendogramas para un mismo genotipo, permitió comprobar la utilidad de la RAPD para distinguir semillas con diferente grado de envejecimiento. La RAPD resultó una metodología robusta y confiable para realizar pruebas de identidad varietal.

**Agradecimientos.** A la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del IPN (Becas de Exclusividad y PIFI) por el financiamiento otorgado, al INIFAP por proporcionar el germoplasma de maíz, y al Laboratorio de Biotecnología de la UPIBI por las facilidades brindadas

#### Referencias.

1. Arus, P; Tanksley, S. D; Orton, T. J; Jones. R. A. (1982). Electrophoretic variation as tool for determining seed purity and for breeding hybrid varieties of Brassica oleracea. *Euphytica* 31: 417-429.
2. Burris. J. S. (1977). Effect of location of production and natural maternal parentage seedling vigour in hybrid maize (*Zea mays*). *Seed Sci. and Technol.* 5: 703-708.
3. Valadez, M. E. y Kahl, G. (2000). Huellas de ADN en Genomas de Plantas: Teoría y protocolos de laboratorio. Mundi-Prensa, México, D.F. 147 p.
4. Welsh, J. and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.
5. Williams, J. G. K; Kubelik, A. R; Livak, K. J; Rafalski, J. A; Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6335.