



USAC
TRICENTENARIA
Universidad de San Carlos de Guatemala

DG Dirección General
de Investigación
Universidad de San Carlos de Guatemala

**UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN
PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y
NUTRICIÓN (PRUNIAN)**

INFORME FINAL

“Evaluación genética a través de Marcadores Moleculares (Microsatélites) para la identificación de genotipos de maíz (*Zea mays* L.) tolerantes a estrés hídrico, para el corredor seco de Guatemala”.

Equipo de investigación
PhD. Carlos Alfonso Orozco Castillo
Inga. Agra. Paola Amarilis Cedillo Gámez
Krystal Smile de Jesús García Méndez.

24 de noviembre 2016



M.Sc. Gerardo Arroyo Catalán
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Inga. Liuba María Cabrera Villagrán
Coordinadora del Programa de Investigación en
Alimentación y Nutrición (PRUNIAN)

PhD. Carlos Alfonso Orozco Castillo
Coordinador del proyecto.

Inga. Agra. Paola Amarilis Cedillo Gámez
Investigador

Krystal Smile de Jesús García Méndez
Auxiliar de Investigación II

Partida Presupuestaria
4.8.63.7.42
Año de ejecución: 2016.

Contenido

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	7
5. Resumen.....	8
6. Abstract	8
7. Introducción	9
Marco teórico y estado del arte	11
El cultivo de maíz en Guatemala.....	11
Diversidad genética del maíz en Guatemala.....	12
Descriptor de cada genotipo de maíz evaluado:	13
Estrés hídrico.....	15
Tolerancia a la sequía con un alto potencial hídrico.....	16
Corredor seco de Guatemala	16
Cultivo in vitro de maíz.....	17
Marcadores Moleculares	17
Microsatélites o repetición de secuencias simples (SSR).....	18
Técnicas e instrumentos	20
Establecimiento in vitro de embriones de maíz	21
Metodología de análisis molecular	22
Protocolo de Extracción ADN del CIMMYT:	23
Cuantificación del ADN.....	24
10. Resultados	30
Metodología de Laboratorio.....	30
Siembra in vitro	30
Extracción de ADN.....	31
Tejido vegetal para la extracción de ADN.	31
Evaluación de marcadores moleculares.....	32
Resultados rendimiento fase experimental.....	37
Manejo Agronómico.....	39
Cosecha de las plantas	40

12. Conclusiones	45
13. Referencias	46

Índice de Figuras

Figura 1 Ubicación en el cromosoma de los algunos de los microsatélites a evaluar.....	19
Figura 2. Genotipos evaluados por color	27
Figura 3. Condiciones climáticas estación meteorológica San Agustín Acasaguastlán....	28
Figurara 4. Secuencia protocolo desinfección.....	31
Figura 6: patrón de bandas electroforéticas para los marcadores SSR phi 63 y 84 con el genotipo 13 (CLYQ265).....	33
Figura 7. Patrón de bandas electroforéticas para los marcadores SSR phi029, phi065, umc 1332, umc1171 en gel de poliacrilamida al 6%.....	34
Figura 8. Ubicación de los microsatélites SSR amplificados de izquierda a derecha phi029, umc 1332, phi063 y phi084.....	34
Figura 9. Medidas de diversidad genética por locus para los marcadores amplificados....	36
Figura 10. Medidas de Diversidad Genética.....	36
Figura 11. De izquierda a derecha, mazorca genotipo HB83, ICTAB9, ICTA Maya QPM e ICTA La Maquina 7422.....	41
Figura 12: Susceptibilidad e intensidad de sequia por genotipo.....	42
Figura 13 : Mapa de precipitación media anual del el progreso departamento de El Progreso Guatemala.....	51
Figura 14. Mapa de amenaza por sequía, para la república de Guatemala. Fuente: MAGA (2003).....	52
Figura 15. Repeticiones en fase de invernadero por cada genotipo.....	53

Índice de tablas

Tabla 1. Genotipos de maíz procedentes del CYMMIT evaluados.....	20
Tabla 2. Genotipos de maíz provenientes del ICTA evaluados.....	21
Tabla 3. Listado de SSR evaluados.....	21
Tabla 4. Protocolo desinfección.....	22
Tabla 5. Ecuaciones para estimar el riego.....	26
Tabla 6. Ecuaciones para determinar la Susceptibilidad a sequía.....	29
Tabla 7. Protocolo amplificación PCR.....	32
Tabla 8. Matriz de datos binarios, para la amplificación de 4 marcadores SSRs.	35
Tabla 9. Características de los materiales utilizados.....	38
Tabla 10. Análisis de suelo Finca Sabaneta, El Progreso, Guatemala.....	39
Tabla 11. Análisis de físico de suelo Finca Sabaneta, El Progreso, Guatemala.....	39
Tabla 12. Análisis de físico de suelo.....	40
Tabla 13. Peso promedio de granos de maíz por genotipo (g) evaluados y altura promedio por genotipo.....	41

Título completo del proyecto

Evaluación genética a través de Marcadores Moleculares (Microsatélites) para la identificación de genotipos de maíz (*Zea mays* L.) tolerantes a estrés hídrico, para el corredor seco de Guatemala.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
CIMMYT:	Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo
DDS:	Días después de la siembra
DTPW:	Drought Tolerance Population (Poblaciones tolerantes a la sequía de maíces dentados blancos)
FAUSAC:	Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala
H:	Heterocigocidad
H ₂ :	Heredabilidad
HI:	Harvest Index (Índice de Cosecha)
ICTA:	Instituto de Ciencia y Tecnología Agropecuaria de Argentina
INSIVUMEH	Instituto Nacional de Sismología, Vulcanología, Meteorología e Hidrología
IS:	Índice de Selección
ITS:	Índice de Tolerancia a la Sequía
msnm:	metros sobre el nivel del mar
PCR:	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la Polimerasa)
QPM:	Quality Protein Maize (Alta calidad proteínica).
QTL:	Quantitative trait loci (<i>loci</i> de un carácter cuantitativo)
SSRs:	Simple Sequence Repeats (Secuencias repetidas cortas-Microsatelites)

5. Resumen

El cultivo de maíz en Guatemala cubre un aspecto cultural y forma parte de la subsistencia económica, seguridad alimentaria de muchas familias, actualmente el cambio climático obliga a buscar que variedades se adapten al cambio, especialmente tolerantes a estrés hídrico (MAGA , 2016).

Se trabajó con el establecimiento de 22 genotipos de maíz, 15 procedentes del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo CIMMYT y 7 del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola ICTA, los cuales fueron sometidos a técnicas biotecnológicas (marcadores moleculares, micro satélites SSR y cultivo de células y tejidos vegetales), para el establecimiento de las plantas se trabajo la siembra in vitro de los 22 genotipos a ser analizados, y se evaluaron 20 pares de SSR.

Fue evaluado el índice de susceptibilidad a sequía por medio del rendimiento de cada genotipo tomando en cuenta las condiciones climáticas y las características del suelo para el Departamento de El Progreso, Guatemala.

Se analizo la hertocigocidad de los genotipo con el software InfoGene ® para realizar una comparación sobre el resultado de la amplificación de los marcadores microsatélites con los rendimientos para establecer cuál de los genotipos podría tener en su genoma genes que le proporcionen las características de tolerancia a sequia.

Palabras Clave: resistencia, rendimiento, técnicas biotecnológicas, índices, susceptibilidad.

6. Abstract

Maize cultivation in Guatemala covers a cultural aspect and is part of the economic subsistence, food security of many families, climate change nowadays requires that varieties adapt to change, especially tolerant to water stress (MAGA, 2016).

The work involved the establishment of 22 maize genotypes, 15 from the International Maize and Wheat Improvement Center CIMMYT and 7 from the Institute of Agricultural Science and Technology ICTA, which were subjected to biotechnological techniques (molecular markers, SSR micro satellites and culture Of plant cells and tissues). In order to establish the plants, the in vitro seeding of the 22 genotypes to be analyzed was carried out, and 20 pairs of SSR were evaluated.

The index of susceptibility to drought was evaluated by means of the yield of each genotype taking into account the climatic conditions and the characteristics of the soil for the Department of El Progreso, Guatemala.

We analyzed the genotype inheritance with the InfoGene ® software to perform a comparison on the result of the amplification of the microsatellite markers with the yields to establish which of the genotypes could have genes in their genome that provide the characteristics of drought tolerance

Palabras Clave: resistencia, rendimiento, técnicas biotecnológicas, índices, susceptibilidad.

7. Introducción

El cultivo de maíz (*Zea mays* L) es uno de los cultivos de mayor importancia en Guatemala, ya que es un componente básico para la alimentación, posee una importancia social,

cultural y económica. Durante el 2010 la FAO planteo que “Debido al cambio climático el porcentaje de precipitación pluvial ha venido disminuyendo con el tiempo, es por ello que se hace necesaria la implementación de genotipos de maíz (*Zea mays* L) que soporten el estrés hídrico, a su vez se hace importante ya que el maíz es una fuente de alimento y forma parte de la subsistencia económica, seguridad alimentaria de muchas familias en Guatemala (FAO, 2010). La variabilidad genética de maíz se conforma por la riqueza de cultivares existentes desde las más antiguas como lo es el teocinte hasta las más evolucionadas (Preciado, 2011).

Guatemala posee una abundante diversidad genética de maíz entre las que se encuentran variedades distribuida a lo largo del país, en el altiplano occidental de Guatemala se localiza la mayor diversidad genética (Wellhausen, E.J., Fuentes O., A., Hernández Corzo, A. and Mangelsdorf, P.C. 1957) describen 13 razas y 9 sub razas de maíz en Guatemala. De las 14 razas reportadas para Centroamérica, Guatemala posee 13 (FAO 2008). Sin embargo las razas o variedades del altiplano presentan un ciclo fenológico muy largo y apto únicamente para variedades entre los 1600-2500msnm.

En Guatemala no se han practicado análisis moleculares a genotipos de maíz para evaluar sus características genéticas relacionadas con la tolerancia al estrés hídrico, es por ello que mediante el uso de técnicas biotecnológicas las cuales permiten la obtención de material vegetal in vitro mediante el cultivo de tejidos y células vegetales y la identificación de genes de resistencia con marcadores moleculares, la técnica de microsatélites ó SSR (simple sequence repeat), se utilizaran para indicar presencia o ausencia de los genes de tolerancia a estrés hídrico, llevando al mejoramiento genético (Vigouroux, et al., 2,008). Se evaluaron 20 pares de microsatélites ya que con los SSRs se pueden encontrar s diferencias cuando se comparan entre ellos, las diferencias radican especialmente en el número de alelos reportados y en la heterocigocidad esperada, debido a la característica dinucléotida, ó triculcléotida de los SSRs seleccionados (Vigouroux *et al.*, 2002; Reif *et al.*, 2006).

El objetivo de la investigación fue evaluar con 22 genotipos de maíz procedentes tanto del CYMMIT en México y del ICTA Guatemala, con 22 pares de microsatélites phi y umc,

esto con la finalidad de realizar un mapeo genético y establecer si los genotipos presentan un alelo en común relacionado a la tolerancia al estrés hídrico, se realizó una prueba de estrés hídrico con un modelo estadístico para determinar los índices de sequía con un nivel de significancia de $z=1.96$, se tomó en consideración eliminar el valor de β (error II).

Marco teórico y estado del arte

El cultivo de maíz en Guatemala

En Guatemala el cultivo de maíz ocupa una superficie de 827,155 Ha, es el cultivo de mayor importancia en cuanto aporte energético en relación a la seguridad alimentaria y nutricional.

En los departamentos del país con mayores niveles de pobreza y pobreza extrema se cultiva dentro de los agroecosistemas de milpa, el sistema milpa ha jugado por generaciones un importante papel en la conservación de especies nativas y ha contribuido a la diversificación de alimentos para las familias, especialmente en el área rural (FAO 2008).

El principal objetivo del cultivo de maíz blanco en Guatemala es satisfacer las necesidades nacionales con la producción interna, ya que este es utilizado principalmente como alimento humano, a diferencia del maíz amarillo que se emplea para alimentación animal de manera directa y elaboración de concentrados. Durante los meses de escases de maíz blanco especialmente entre mayo y julio, se acentúa la vulnerabilidad alimentaria de las familias guatemaltecas, ya que debido a la escasez de recursos no pueden abastecerse del producto en los mercados (MAGA 2016).

Diversidad genética del maíz en Guatemala

Guatemala está reconocida como centro de origen de maíz, la mayor diversidad genética de maíz se encuentra distribuida en el altiplano occidental de Guatemala. Wellhausen, E.J., Fuentes O., A., Hernández Corzo, A. and Mangelsdorf, P.C. 1957 describen 13 razas y 9 sub razas de maíz en Guatemala. De las 14 razas reportadas para Centroamérica, Guatemala posee 13 (FAO 2008).

Descriptor diversidad genética de maíz evaluada:

Cardona 2,010 define como diversidad genética la multiplicidad en las frecuencias alélicas y el ambiente que proveen la naturaleza el fenotipo de cada individuo.

Descriptor de cada genotipo de maíz evaluado:

Las CML son líneas desarrolladas en el Programa Global de Maíz conjuntamente con el CIMMYT, están adaptadas a ambientes tropicales y subtropicales, son líneas aun no liberadas, son un grupo heterótico tienen buena aptitud combinatoria con otras líneas del mismo grupo; los híbridos resultantes pueden ser utilizados ya sea en cruza simples o como progenitores femeninos de híbridos triples o de cruza doble (CIMMYT, 2013).

CML549 (CLWRCW105)

Origen AF14A-403-1 presenta una madurez tardía en ambientes tropicales, grano blanco semidentado y excelente aptitud combinatoria en general en condiciones óptimas y cuando hay escasez de nitrógeno o sequía. Esta línea está clasificada como línea del grupo heterótico con buenos resultados al ser combinada con las CML494 y CML550.

CML550 (CLWN201)

Origen AF13A-482-6 con madurez intermedia en ambientes tropicales, de grano blanco cristalino, presenta buenos resultados al ser combinado en condiciones de escasez de nitrógeno y de sequía. Clasificada como línea del grupo heterótico B del CIMMYT y combina bien con las CML495, CML549 y CML552.

CML551 (CL02720)

Origen AF13A-481-10, genotipo que presenta una madurez tardía, grano amarillo cristalino recomendada para ambientes tropicales (alturas de 0-1500msnm), y excelente aptitud

combinatoria en condiciones óptimas y cuando hay sequía. Esta línea está clasificada como línea del grupo heterótico B del CIMMYT.

ICTA B1

Desarrollado por el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola ICTA, adaptable a condiciones de la zona del trópico bajo de 0-1400msnm, variedad de polinización libre, grano de color blanco y dentado, alto contenido nutritivo, resistente a enfermedades (Inventario Centroamericano de Tecnologías de Maíz y Frijol, 2016).

ICTA B7

Desarrollado por el ICTA, ámbito de tecnología ICTA/CIMMYT/PRM, grano de color blanco semi-dentado, adaptable a condiciones marginales de la zona Nor-Oriente y algunas regiones de la Costa Sur-Occidental de Guatemala zonas con problemas de sequía, ciclo vegetativo de 110 días, 53 días a floración, tolerante a enfermedades foliares y de la mazorca, resiste condiciones de baja humedad en el suelo provocada por la escasez de lluvias o canícula (Cardona, 2014).

ICTA La Maquina 7422

Grano color blanco Semi-cristalino, ideal para alturas desde los 0 hasta los 1400msnm, variedad de polinización libre, ciclo vegetativo de 120 días, tolerante a algunas enfermedades y alto potencial de rendimiento inclusive en casos de sequia (Inventario Centroamericano de Tecnologías de Maíz y Frijol, 2016).

ICTA B5

Presenta un grano blanco cristalino, ciclo vegetativo de 120 días, variedad de ciclo precoz, recomendada para áreas de poca precipitación, adaptable a condiciones de siembra en asocio (Inventario Centroamericano de Tecnologías de Maíz y Frijol, 2016).

ICTA HB-83

Presenta una adaptación a todas las zonas maiceras de Guatemala, posee una buena aceptación por los compradores de grano, tolerante al acame provocados por vientos (Inventario Centroamericano de Tecnologías de Maíz y Frijol, 2016).

ICTA B9 (Alta Calidad Proteínica)

Presenta un alto contenido de proteína ya que contiene el doble de los aminoácidos esenciales Lisina y Triptófano en relación con el maíz común (Inventario Centroamericano de Tecnologías de Maíz y Frijol, 2016).

Hibrido ICTA Maya^{QPM}

Presenta un alto contenido de proteína ya que contiene el doble de los aminoácidos esenciales Lisina y Triptófano en relación con el maíz común, es un híbrido mejorado con el gen mutante Opaco 2(0-2) mediante mejoramiento convencional, tolerante al acame provocados por vientos (ICTA, 2016).

Estrés hídrico

El agua es indispensable en la vida de las plantas e influye en su crecimiento y productividad. La poca disponibilidad de agua en el suelo puede ocasionar que la transpiración exceda el agua absorbida por las raíces, lo que se conoce como estrés hídrico (Munns y Tester, 2008).

Actualmente la medida más utilizada para estimar este parámetro es el potencial hídrico (Ψ), el estrés hídrico es una de las principales causas de muerte en plantas, ocurre cuando la transpiración excede el agua absorbida por las raíces (Taiz y Zeiger, 2002, citados por W Luna-Flores et al., 2012).

Tolerancia a la sequía con un alto potencial hídrico

La tolerancia fisiológica de cada cultivo puede tener uno o varios factores en los cuales se encuentran la modificación de las hojas, el crecimiento de las raíces ya que a una mayor profundidad en el suelo, menor exposición al sol y al calor, lo que impide el desecamiento a gran escala y también entre mayor biomasa tenga la raíz mayor superficie tendrá para tomar agua del suelo (Sponchiado 1985).

Existen diversas variables las cuales están dirigidas a determinar las características de las plantas ante la sequía, entre las cuales se menciona la más importante el índice de tolerancia al estrés hídrico, el cual está asociado a la respuesta fisiológica expresada por la planta se obtiene a partir del índice potencial de los genotipos en riesgo (sometidos a esteres hídrico) tomando como base el rendimiento en grano por mazorca para el cultivo de maíz (Fischer, 1,978),

Corredor seco de Guatemala

Expertos en cambio climático, desertificación y sequía, señalan que el Corredor Seco del país abarca siete departamentos, pero que en estos momentos se ha extendido. “Tenemos áreas bastante afectadas por sequía, y áreas degradadas en Quiché, San Marcos, una parte del litoral de la Costa Sur, Chimaltenango, Sololá y Totonicapán”, aseveran. Según indica, la sequía se ha establecido en los últimos años en un 75% del territorio nacional. “La atención primaria se centró en el Corredor Seco, pero ahora ya tenemos que este se ha extendido en casi los 22 departamentos de Guatemala, no digamos la parte sur del Petén. (MAGA, 2016)

Cultivo in vitro de maíz

La regeneración de plantas a partir de cultivos de células somáticas in vitro es una de las herramientas básicas de la biotecnología. Las técnicas de cultivo de células y tejidos de maíz han sido mejoradas en forma sensible y son comparables con el amplio espectro de sistemas en estudios genéticos que se aplican en otras especies. La iniciación y el mantenimiento de cultivos de células y tejidos de maíz y la exitosa regeneración de las plantas dependen del genotipo usado, de la elección de los tejidos, del estado de desarrollo de la planta, del medio de cultivo y del ambiente en cada etapa del proceso de cultivo (Paliwal, R., 2001). Los embriones inmaduros han sido los explantes más extensivamente usados para la iniciación de cultivos de tejidos diploides regenerables. Otros explantes usados para la regeneración son secciones de raíces, mesocotilo, nudos de coleoptilo, vástagos de plántulas, secciones de tallos, internudos y embriones maduros (Paliwal, R., 2001).

Marcadores Moleculares

Son técnicas que se utilizan para estimar la diversidad entre organismos, con ellos se evita la intervención derivada de cambios ambientales los cuales afectan los caracteres morfológicos ya que los SSR se basan en la variación a nivel de secuencia genética (Konrad 1994). Existen diversos tipos de marcadores moleculares los cuales dependen de características específicas, variar tanto en los niveles de información proporcionados y costos (Ferreira, 1,998).

Microsatélites o repetición de secuencias simples (SSR)

Los microsatélites son secuencias de un máximo de 6 pares de bases repetidas muchas veces, por ejemplo: AC (40) veces, AAT (8) veces, AAT (17) veces, que van seguidas de otras secuencias distintas dentro del genoma en organismos procariontes y eucariontes. Están presentes en regiones codificadoras y no codificadoras de genes, las cuales se caracterizan por tener un alto grado de polimorfismo (Zane *et al.*, 2002 citado por Wilches, A. 2004).

Las secuencias están distribuidas más o menos al azar dentro del genoma en una frecuencia relativamente alta (10 al 50% del genoma de algunos organismos). Su cantidad depende de la longitud del ADN. Permiten mostrar altos niveles de polimorfismo y pueden presentar interrupciones por secuencias no-repetitivas. Se cree que surgieron por medio de dos mecanismos: superposición (*slippage*) durante la replicación de una de las hebras de ADN, o por un entrecruzamiento inusual entre cromosomas homólogos durante la meiosis (Zane *et al.*, 2002 citado por Wilches, A. 2004).

Pueden estar dentro de zonas codificantes y no codificantes del ADN, pueden codominantes y poseen una alta tasa de mutación (Li, Korol *et al.* 2004), por lo que se conoce que cuentan con una alta tasa de polimorfismo, dándole una importancia relevante en los análisis de pedigrí y QTLs (Ellegren 2,004).

Caracterización Genotípica

Para el análisis genético fueron utilizados 20 microsatélites de la colección general SSRs tomados de los marcadores disponibles en la base de datos genómicos y genéticos en línea disponible para maíz (Maize Genetics and Genomics Database; <http://www.maizegdb.org/>), descritos en la tabla 3.

Se seleccionaron estos 20 marcadores en base a que cubrían los 10 cromosomas del maíz, con polimorfismos presentados en investigaciones previas para diversos germoplasmas de maíz, con un patrón de amplificación claro y que la identificación de alelos fuera fácil.

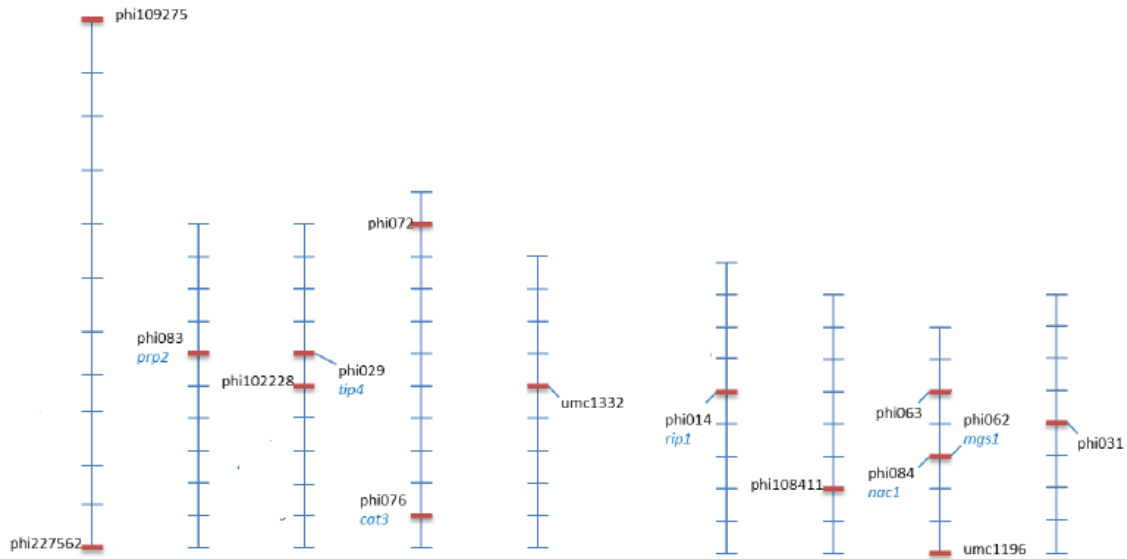


Figura 1. Ubicación en el cromosoma de los algunos de los microsatélites a evaluar (<http://www.maizegdb.org/>).

9. Materiales y métodos

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Agronomía ubicado en el segundo nivel de la Unidad de Vinculación y Gestión de Recursos UVIGER, a una latitud de 14°58'06"N, longitud 90°55'60"O y una altura de 1,460msnm. Investigación experimental: El tipo de investigación realizada fue experimental del tipo exploratoria

Técnicas e instrumentos

a) Materiales evaluados:

Se evaluaron 15 genotipos proporcionados por el CYMMYT los cuales se muestran en la tabla 1, y siete genotipos desarrollados por el Instituto de Ciencia Tecnología y Agricultura los cuales se muestran en la tabla 2, estos genotipos pertenecen a la zona del trópico, ideales para alturas desde los 0 hasta los 1400msnm (tabla 2.).

Los materiales fueron evaluados con 20 marcadores moleculares del tipo microsatélites o por sus siglas en inglés ssr los cuales se resumen en la tabla 3.

Tabla 1. Genotipos de maíz procedentes del CYMMIT evaluados.

Material No.	Material	Origen	Certificación
Entry: 1	CML551=CL02720	AF13A-481-10	SH 14-204
Entry: 2	CLQR CWQ83	AF12A-481-30	SH 15-53
Entry: 3	CML549=CLRCW105	AF14A-403-1	SH14-215
Entry: 4	CLRCY015	AF14A-451-14	SH14-378
Entry: 5	CLRCY016	AF12A-481-74	CERT 13-4
Entry: 6	CLWN241	AF12B-5401-9	SH-14-215
Entry: 7	CLWN247	AF14A-401-38	SH-14-215
Entry: 8	CLWN306	AF14A-401-57	SH-14-215
Entry: 9	CLWN345	AF14A-401-97	SH-14-215
Entry: 10	CLWN379	AF14A-401-112	SH-14-215
Entry: 11	CLYN214	AF14A-451-77	SH-14-215
Entry: 12	CLYN352	AF14A-451-88	SH-14-215
Entry: 13	CLYQ265	AF12B-5251-1	CERT 13-7
Entry: 14	CML269	AF14A-421-5	SH 15-107
Entry: 15	CML550=CLWN201	AF13A-482-6	CERT.13-24

Tabla 2. Genotipos de maíz provenientes del ICTA evaluados

Material No.	Material
Entry: 16	ICTA B1
Entry: 17	ICTA B7
Entry: 18	ICTA La Maquina 7422
Entry: 19	ICTA B5
Entry: 20	ICTA HB-83
Entry: 21	ICTA B9 ^{ACT}
Entry: 22	ICTA MAYA ^{QPM}

Tabla 3. Listado de SSR evaluados.

SSR	Forward	Reverse	Rango en pares de bases
phi014	AGATGACCAGGGCCGTCAACGAC	CCAGCTCACCAGCTTGCTCTTCGTG	431-435
phi029	TGTCTTTCTTCCCTCCACAAGCAGCGATTTCAGTTGCCACCGACGAAGAACT		150-161
phi031	GCAACAGGTTACATGAGCTGACGA	CCAGCGTGCTGTTCCAGTAGTT	186-225
phi063	GGCGGCGGTGCTGGTAG	CAGCTAGCCGCTAGATATAACGCT	154-180
phi065	AGGGACAAATACGTGGAGACACAG	CGATCTGCACAAAGTGGAGTAGTC	116-123
phi072	ACCGTGATGATTAATTTCTCCAGCCT	GACAGCGCGCAAATGGATTGAACT	142-162
phi076	TTCTCCGCGGCTTCAATTTGACC	GCATCAGGACCCGCAGAGTC	156-177
phi084	AGAAGGAATCCGATCCATCCAAGC	CACCCGTAAGTGGAGAAAACCC	148-157
phi108411	CGTCCCTTGGATTTGAC	CGTACGGGACCTGTCAACAA	116-123
phi109275	CGGTTTCATGCTAGCTCTGC	GTTGTGGCTGTGGTGGTG	108-134
phi114	CCGAGACCGTCAAGACCATCAA	AGCTCCAAACGATTCTGAACTCGC	135-166
phi227562	TGATAAAGCTCAGCCACAAGG	ATCTCGGCTACGGCCAGA	309-325
phi374118	TACCCGGACATGGTTGAGC	TGAAGGGTGTCCCTCCGAT	214-238
umc1161	GGTACCGCTACTGCTTGTACTGC	GCTCGCTGTTGGTAGCAAGTTTAA	140-160
umc1196	CGTGCTACTACTGCTACAAAGCGA	AGTCGTTTCGTGCTTCCGAACT	137-173
umc1304	CATGCAGCTCTCCAAATTAATCC	GCCAACTAGAAGTACTGCTGCTCC	121-141
umc1332	CCTCTTGCTTCCCTCGTCATGTACT	AAGGAGCTGGAACATAAAACACCA	126-147
umc1947	GGATCTCACCCCTGCTGTC	ATCACGCGCTCACTCTCCTCT	130-160
phi083	CAAACATCAGCCAGAGACAAGGAC	ATTCATCGACGCGTCACAGTCTACT	125-139
phi102228	ATCCGACGCAATCAACA	TTCATCTCCTCCAGGAGCCTT	122-131

Establecimiento in vitro de embriones de maíz

Materiales: Semillas de los 22 genotipos de maíz, frascos de 100ml con medio nutritivo (Murashige y Skoog) estéril, pinzas, bisturí, guantes, mascarilla, palillos estériles, agua desmineralizada estéril, hipoclorito de sodio al 1% Etanol al 95°, alcohol 70°

Método: se desinfecto el área de trabajo, con alcohol 70° posterior a la desinfección del área se procedió a la desinfección de los explantes, para lo cual se utilizo el protocolo de desinfección siguiente:

Tabla 4. Protocolo desinfección

Reactivo	Tiempo
Benomil (1g/l)	20 minutos
NaCl2 2%	5 minutos
Agua desmineralizada estéril	3 lavados

Extracción y siembra del embrión: cuidadosamente se presiono suavemente el grano de maíz, para facilitar la salida del embrión, se sujeto el embrión con un palito estéril, se procedió a abrir el tubo de ensayo con medio de cultivo estéril y flamear la boca del tubo, se dejó caer el embrión dentro del tubo, flameo nuevamente la boca del tubo se procedió a cerrarlo.

Incubación: El embrión permaneció en incubación a una temperatura de 25°C en un fotoperiodo de 16 horas luz y ocho de oscuridad, durante una semana. Renovación de medio de cultivo: posterior a la semana se trasladarán los epicotilos a un nuevo medio de cultivo para que continúen su desarrollo, hasta alcanzar un tamaño foliar considerable para la toma muestras de ADN (Orozco, C., et al 2013).

Metodología de análisis molecular

La fase molecular se trabajo siguiendo protocolo propuesto por CIMMYT 2,006 para la extracción del ADN genómico, y posteriormente se utilizo la técnica de la amplificación de la polimerasa para la evaluación de los microsatélites, la preparación de geles de agarosa al 2% y poliacrilamida al 4-6%.

Protocolo de Extracción ADN del CIMMYT:

Equipo	Reactivos
Tubos Eppendorf 2mL	Nitrógeno líquido
Pistilos para macerar	Solución amortiguadora CTAB2%
Incubadora (baño María)	Cloroformo:Octanol
Centrifuga	ARNasa
Potenciómetro	Isopropanol
Gradillas	Etanol al 70%
Cámara de extracción de gases	Etanol Absoluto
Congelador -20°C	Buffer TE
Micropipetas diferentes volúmenes	Buffer TBE
	Acetato de Sodio
	Acetato de Amonio
	Agarosa

Procedimiento

- Se colocaron 300 y 400 mg de tejido liofilizado y molido en un tubo de 1.5-2 ml. Para la maceración del tejido foliar joven se utilizó nitrógeno líquido.
- Se obtuvieron 50 a más de 100 µg de ADN / 100 mg de tejido fresco, procedente de las fases in vitro.
- Se agregaron 900.0 µl de solución amortiguadora CTAB (solución compuesta por Tris 1M, NaCl 5M, EDTA 0.5M y Cetiltrimetilamonio 2% aforado con agua desmineralizada) para extracción.
- Se agito en vortex por 1 minuto para homogeneizar la muestra.
- Se colocaron en baño María las muestras, a una temperatura de 65-67°C
- Se agitaron en vortex por 1 minuto para homogeneizar la muestra.

- g) Se incubaron durante 60 a 90 minutos en un horno a 65°C agitando los tubos continuamente con suavidad.
- h) Se retiraron los tubos del horno. Se dejarán enfriar los tubos y luego se agregaran 500 µl de cloroformo/octanol (24:1). Mezclando y agitando suavemente los tubos durante 10 minutos.
- i) Se centrifugo por 10 minutos a 12,000rpm a temperatura entre 20-25°C.
- j) Luego de centrifugar se tomo la fase acuosa con una Micropipeta y se colocara en un tubo nuevo de 1.5-2.0µl.
- k) Se agregaron 500 ul de cloroformo/octanol y agite suevamente durante 5 a 10 minutos.
- l) Se centrifugo por 10 minutos a 13,000rpm a temperatura entre 20-25°C.
- m) Con una pipeta se tomo nuevamente la capa acuosa superior a otros tubos de 1.5-2.0ul.
- n) Se mezclo invirtiendo con suavidad los tubos.
- o) Se incubo durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- p) Se agregaron 600ul de 2-propanol.
- q) Se mezclo invirtiendo con suavidad los tubos.
- r) Se lavo el ADN precipitado con etanol al 70% frío.
- s) Se realizo al menos dos lavados de ADN (Lavado 1: 76% de EtOH, 0.2 M NaOAc, Lavado 2: (76% EtOH, 10 mM NH₄oAc).
- t) Se re suspendió con agua Tri destilada libre de ADNasas y ARNasas.
- u) Se trabajará un gel de Agarosa al 1.5% para verificar la integridad del ADN extraído, caso contrario se trabajará con otro protocolo (CTAB).

Cuantificación del ADN

Para la cuantificación del ADN, se usará el EQUIPO Espectrofotómetro marca Eppendorf

®. El protocolo utilizado se muestra a continuación:

- a) Se realizaron una diluciones de ADN extraído 1:200 en agua Tridestilada, 195µl de buffer con 5µl del ADN re-suspendido. Homogenizar vigorosamente. O agitar con vortex.
- b) Se encendió el equipo. Se escogerá la opción DNA: RNA. Se indicarán el factor de conversión $A_{260nm} 1.0=50.0\mu g/ml$ y factor de dilución 200.000.
- c) Se blanqueo con 200µl de agua Tridestilada.
- d) Se determino la concentración de las muestras colocando 200µl de la dilución preparada en la celda de cuarzo.
- e) Se limpiaron las celdas utilizando etanol al 70%. Se enjuagará cada celda entre muestras.
- f) Se interpretaron los resultados de la cuantificación y evaluación de la pureza A_{260nm}/A_{280nm} .
- g) Una razón menor de 1.700 indico la presencia de proteínas, y una razón mayor a 1.900 indicó presencia de ARN.
- h) Se hicieron diluciones de las muestras según la cantidad necesaria de ADN necesarias para realizar la PCR.

Evaluación de marcadores moleculares

Se evaluaron 20 marcadores moleculares tipo microsatélites (Tabla 3) ((Maize Genetics and Genomics Database; <http://www.maizegdb.org/>), se realizo la amplificación con la reacción de la cadena de polimerasa (PCR por sus siglas en ingles), de acuerdo con el protocolo de amplificación propuesto por CIMMYT 2006, con algunas modificaciones.

Evaluación agronómica

Manejo Agronómico

Se trabajaron los genotipos en macetas de 30 cm de altura y 28cm de diámetro (con agujero para drenaje) a las cuales se les adiciono suelo procedente de la finca Sabaneta departamento de El Progreso, Guatemala. En las macetas fueron sembrados los genotipos aclimatados de la fase in vitro.

Durante la prueba a estrés hídrico fueron aplicados seis riegos en el testigo durante todo el ciclo de cultivo hasta cubrir la demanda de 500-800 mm (Doorembos, 1979) distribuido idealmente en las fases fenológicas de la siguiente manera: fase vegetativa 300mm, etapa de floración 200mm y etapa reproductiva 200mm.

Se aplicaron tres fertilizaciones la primera fue una aplicación fertilizante comercial granular 15-15-15 de N-P-K, la segunda una mezcla química de 46-0-0 de N-P-K y de fertilización foliar en formula comercial 20-20-20+EM N-P-K.. Se controló *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Helicoverpa zea* (gusano elotero).

Riego

Para estimar las frecuencias de riego que fueron aplicadas en la etapa de floración, se utilizaron las ecuaciones descritas en la tabla 5, ecuación para determinar la lámina de humedad aprovechable y la lámina de humedad rápidamente aprovechable descrita por Sandoval, 1989.

Tabla 5. Ecuaciones para estimar el riego

LHA	Lámina de humedad aprovechable (cm)	$LHA = (CC - PMP) \times Dap \times Zr \ 100$ %
LHRA	lámina de humedad rápidamente aprovechable	$LHRA = LHA \times DPM$

Genotipos evaluados



Figura 2. Primera Fila (1-6) CML551=CL02720, CLQR CWQ83, CML549=CLRCW105, CLRCY015, CLRCY016, CLWN241, segunda fila (9-12) CLWN247, CLWN306, CLWN345, CLWN379, CLYN214, CLYN352, tercera fila (13-18) CLYQ265, CML269, CML550=CLWN201, ICTA B1, ICTA B7, ICTA La Maquina 7422, cuarta fila (19-22) ICTA B5, ICTA HB-83, ICTA B9 (Fortificado), ICTA Maya QPM.

Los genotipos mencionados anteriormente fueron formados por cruzas simples algunas con los caracteres de los padres tolerantes a sequia.

Por medio de la selección fenotípica (días a madurez, floración, tamaño de la mazorca) en campo fueron llevadas al laboratorio de Biotecnología de la FAUSAC, en donde se determino el rendimiento, producción por planta, peso de 100 semillas.

Variables evaluadas durante la fase experimental.

- Rendimiento por genotipo; obtenido en peso en gramos correspondiente al total de las semillas colectadas por cada genotipo de maíz.

- Producción por planta; Se determino por la cantidad total en gramos entre cada planta cosechada.
- Peso de 100 semillas; se determino en base al peso en gramos de 100 semillas de cada individuo, para establecer el tamaño de la semilla.

Se evaluaron los parámetros climáticos para el departamento de El Progreso tomados por la estación meteorológica más cercana ubicada en San Agustín Acasaguastlán comprendidos entre los años 1,990-2,015.

Para replicar las condiciones del departamento de El Progreso, Guatemala fue necesario conocer la información climática de la región más cercana. En la figura 3 corresponde a las condiciones climáticas en la estación meteorológica de San Agustín Acasaguastlán (1,990-2,015), con una temperatura máxima de 25.24°C, una precipitación anual de 105.52mm de lluvia, una humedad relativa anual en promedio de 77.62% y una velocidad de viento de 7.59km/h.

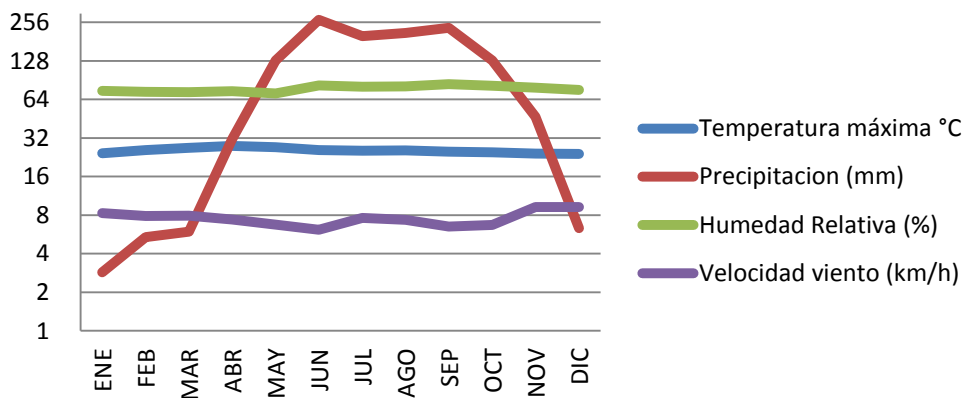


Figura 3. Condiciones climáticas estación meteorológica San Agustín Acasaguastlán. Fuente INSIVUMEH 2016.

Cosecha de las plantas

La cosecha se realizo mediante el corte y conteo de mazorcas de cada genotipo.

Análisis de datos

Se utilizo el modelo estadístico $N_j = (2(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 \sigma^2) / \Delta$ para los 22 genotipos de maíz, por lo que se realizaron 8 repeticiones para el rendimiento con un nivel de significancia de $z = 1.96$ para un $\alpha = 0.05$, se tomo en consideración eliminar el valor de β (error II).

Con los datos obtenidos en base al rendimiento se realizo el conteo y pesaje de las semillas para establecer el índice de susceptibilidad a sequía tomando como base las ecuaciones de Fischer y Maurer 1978.

Las variables de respuesta fueron el peso de granos de maíz de cada genotipo por unidad experimental. Se tomo como variable de respuesta secundaria la altura promedio de las plantas de maíz en metros (tomada antes de la dobla de las plantas).

Las plantas fueron dobladas a los 90 dds y cosechadas luego de 20 días, las mazorcas se colocaron en bolsas de papel y luego puestas al sol para el secado del grano se determino el porcentaje de humedad del grano según la ecuación de FAO 2015 (% de humedad = peso de agua entre el peso del agua más peso de la metería seca).

Tabla 6. Ecuaciones para determinar la Susceptibilidad a sequía.

Descripción	Ecuación
Contenido de humedad de los granos (FAO, 2015).	% en base húmeda= (PA/PT)*100
rendimiento en kg.ha-1 ajustado a h% constante al 14%	$R = [R_p * (100 - \%h / 86)]$
Índice de intensidad de la sequía (IIS)	$IIS = [1 - (RS/RIS)]$
Índice de Susceptibilidad de Sequía	$ISS_i = [1 - (Rsi / Rri / IIS)]$

Durante el análisis molecular de los microsatélites se realizó un análisis de genética descriptiva para los individuos evaluados con el programa GENALEX versión 6.502 (Brown and Weir, 1,983; Hard and Clark, 1,997; Hedrick, 2,000, Peakall and Smouse 2,006).

Se utilizó el software InfoGene 1.0 para crear un gráfico filogenético a través de una matriz de similitud de DICE (método Neighbour-joining), se realizó un análisis de coordenadas principales mediante las distancias genéticas GENALEX versión 6.502.

Tabla 6. Ecuaciones utilizadas en genética descriptiva.

Ne	Número efectivo de alelos	$1 / (\sum p_i^2)$
I	Índice de Shannon	$- 1 * \sum (p_i * \ln (p_i))$
Ho	Heterocigocidad observada	No. of Hets / N
He	Heterocigocidad esperada	$1 - \sum p_i^2$
F	Índice de fijación	$(He - Ho) / H$

Fuente: Brown and weir 1983.

10. Resultados

Metodología de Laboratorio

Siembra in vitro

Para la siembra in vitro se aplicó el protocolo de desinfección general (Pérez, 1998) correspondiente en sumergir la semilla en una solución de un fungicida (Benomil 1g/l) por un periodo de 20 minutos, posteriormente se agregó en una solución de hipoclorito de sodio (NaCl_2) a una concentración del 2% por 5 minutos y finalmente se realizaron tres lavados con agua desmineralizada estéril. De manera simultánea se trató la semilla antes de

la siembra con un protectante o fungicida demostrando este una respuesta favorable en el proceso de desinfección y germinación.

Proceso de desinfección para la siembra in vitro.



Lavado con Benomil (fungicida) a los 15 genotipos por 20 minutos.



Lavado con NaCl2 al 2% por 2 minutos.



Primer lavado con agua estéril desmineralizada

Figurara 4. Secuencia protocolo desinfección.

Extracción de ADN

Después de la germinación de a siembra in vitro se tomo el hipocolíto de la semilla, se tomaron dos por genotipo y se colocaron en un tubo de 1.5 ml, se maceraron en nitrógeno líquido. A partir de este tejido vegetal macerado se extrajo ADN de los 22 genotipos, por medio del método de extracción CTAB (CYMMIT, 2006).

Tejido vegetal para la extracción de ADN.



Figura 5. Semillas a los 5 días de germinación, se señala el hipocolíto usado en la extracción de ADN.

La calidad del ADN extraído se verifico en geles de agarosa al 1.5% (electroforesis horizontal), y la cuantificación del mismo se realizó utilizando el espectrofotómetro marca Eppendorf ®.

Evaluación de marcadores moleculares

Se trabajaron los PCRs en los termocicladores Bio-Rad® y Eppendorf ®, con el protocolo descritos por CIMMYT 2006, el protocolo final de amplificación se muestra en la tabla 5, se utilizo GoTaq® G2 Green Master Mix en cada una de la reacciones de cadena de la polimerasa, se trabajo con concentración de templado de 150ng.

Tabla 7. Protocolo amplificación PCR.

	Descripción	Temperatura °C	Tiempo min.
A	Desnaturalización	95	10.00
A ₁	Desnaturalización	95	0.30
B	Alineamiento	*	1.00
C	Extensión	72	0.30
D	Ciclos	30	A ₁
E	Enfriamiento	72	0.30
E ₁	Enfriamiento	55	5.00

*Temperatura en °C de alineamiento según cada par de SSR.

A₁= Desnaturalización.

Los productos de la PCR se separaron por electroforesis vertical en una cámara Fisher Biotech®, el gel se trabajó a una concentración del 2% y horizontal en una cámara Bio-Rad® para los geles de poliacrilamida se utilizó una concentración de 6%, ambas electroforesis fueron trabajadas en base al protocolo del CIMMYT 2006, la variación debido a el tamaño de los fragmentos en los SSR los cuales se encontraron entre un rango de 108 a 435 pb (Gonzalo, C., 2013).

En la figura 6 se presentan los patrones de bandas electroforéticas y la matriz de datos binarios con la que se codificó la información para la evaluación de los 22 genotipos y los 20 marcadores, se tomaron como controles positivos los genotipos 18 correspondiente a ICTA La Maquina 522 (Inventario Centroamericano de Tecnologías de Maíz y Frijol, 2016), y y CML 551 (CIMMYT, 2013).

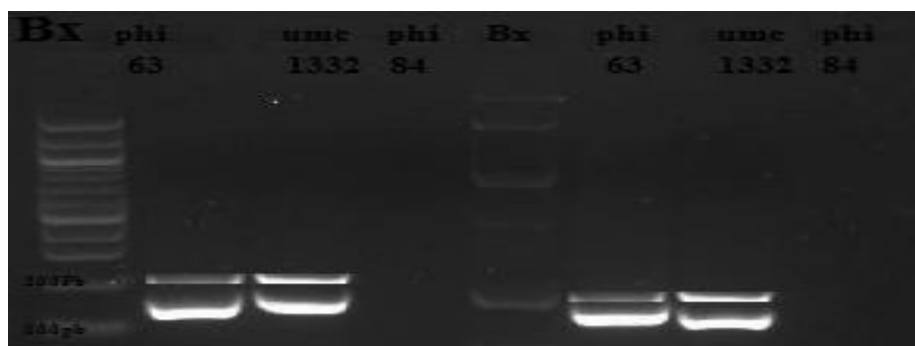


Figura 6: patrón de bandas electroforéticas para los marcadores SSR phi 63 y 84 con el genotipo 13 (CLYQ265), Se presenta un gel de agarosa al 2% luego de la amplificación de la muestra 13 (CLYQ265), donde: Bx corresponde al marcador de peso molecular, gel visualizado en ChemiDoc® XRS Bio-Rad, laboratorio de Biotecnología de la Universidad Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

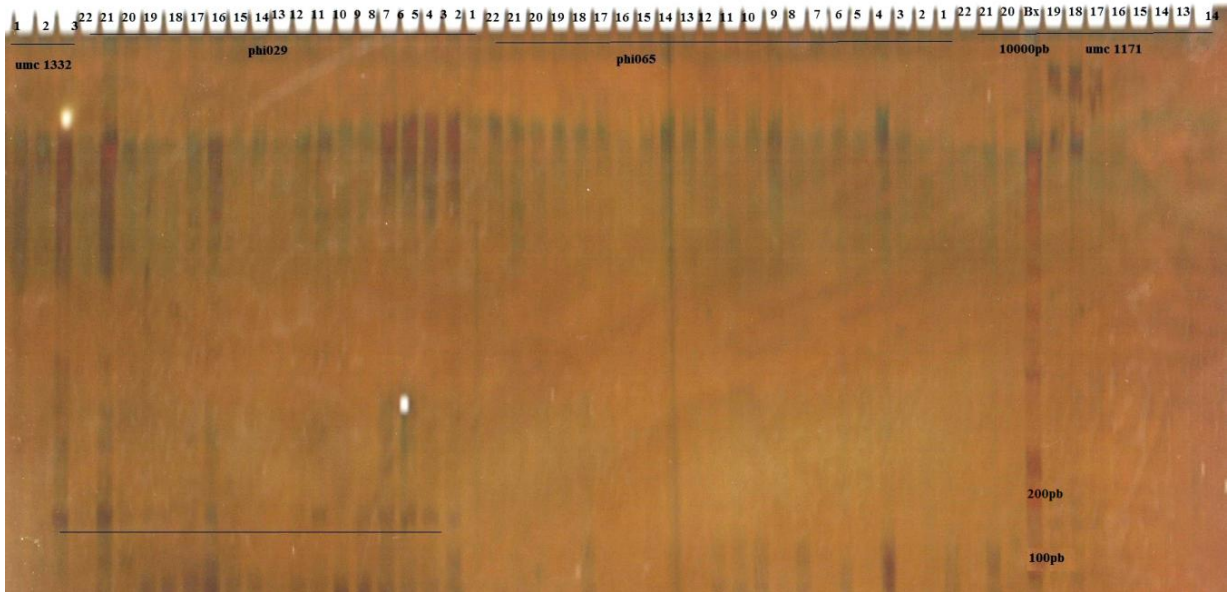


Figura 7. Patrón de bandas electroforéticas para los marcadores SSR phi029, phi065, umc 1332, umc1171 en gel de poliacrilamida al 6%.

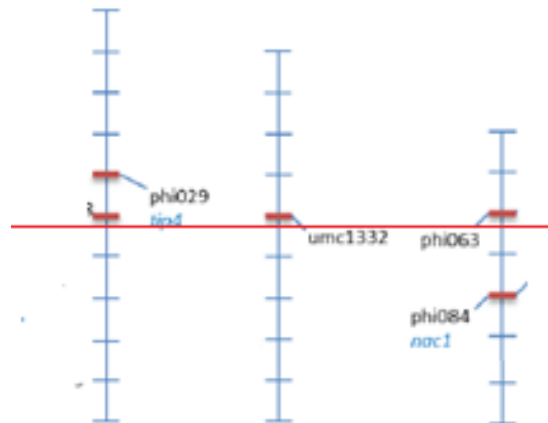


Figura 8. Ubicación de los microsatélites SSR amplificados de izquierda a derecha phi029, umc 1332, phi063 y phi084.

Tabla 8. Matriz de datos binarios, para la amplificación de 4 marcadores SSRs.

Población		individuo/Marcador, Pares de bases	phi029 150-161	phi063 154-180	phi084 148-157	umc1332 126-147
M	1	CML551=CL02720	0	0	1	0
M	2	CLQR CWQ83	0	0	1	0
M	3	CML549=CLRCW105	1	0	0	1
M	4	CLRCY015	1	0	0	0
M	5	CLRCY016	1	1	1	0
M	6	CLWN241	1	0	1	0
M	7	CLWN247	1	0	1	0
M	8	CLWN306	1	0	0	0
M	9	CLWN345	1	0	0	1
M	10	CLWN379	0	0	0	1
M	11	CLYN214	1	0	1	0
M	12	CLYN352	0	1	0	1
M	13	CLYQ265	0	1	0	1
M	14	CML269	0	1	1	0
M	15	CML550=CLWN201	0	1	1	0
M	16	ICTA B1	0	0	1	0
M	17	ICTA B7	1	0	1	0
M	18	ICTA La Maquina 7422	1	1	1	0
M	19	ICTA B5	0	1	1	0
M	20	ICTA HB-83	0	0	0	0
M	21	ICTA B9 (Fortificado)	1	1	0	0
M	22	ICTA Maya QPM	0	1	1	0

La matriz de datos binarios utilizada para representar el patrón de amplificación de los marcadores positivos durante la evaluación, las filas representan a cada genotipos y las columnas a los marcadores SSR en la tabla de datos 0 indica la ausencia y el 1 indica presencia de banda.

Figura 9. Medidas de diversidad genética por locus para los marcadores amplificados.

<u>Locus</u>	<u>Estadístico</u>	
29	Diversidad genética	0.363
	Heterocigosis	0.000
	Heter.insesgada de Nei	0.364
	PIC	0.297
	Número de alelos	2.000
63	Diversidad genética	0.263
	Heterocigosis	0.000
	Heter.insesgada de Nei	0.264
	PIC	0.228
	Número de alelos	2.000
84	Diversidad genética	0.447
	Heterocigosis	0.000
	Heter.insesgada de Nei	0.448
	PIC	0.347
	Número de alelos	2.000
1332	Diversidad genética	0.083
	Heterocigosis	0.000
	Heter.insesgada de Nei	0.083
	PIC	0.079
	Número de alelos	2.000

Fuente: InfoGen®.

Figura 10. Medidas de Diversidad Genética.

<u>Estadístico</u>	
Loci polimorficos(95)	0.750
Heterocigosis promedio	0.000
Heter.insesgada de Nei	0.290
# promedio de alelos	2.000

Fuente: InfoGen®.

Se aplico la prueba de la variabilidad genética con el software InfoGen® y se obtuvo por medio de una prueba de comparaciones múltiples para la prueba de Friderman (número de alelos) todos con valor p mayor a 0.05.

Descriptiva para datos de marcadores

Resumen por primer

Primer	BP	BM	BT	PMF(95)	PIC	E.E.	AMP	PDICMA
29	1	0	1	1.00	0.38	0.00	50.00	6.9E-32
63	1	0	1	1.00	0.37	0.00	40.91	9.4E-34
84	1	0	1	1.00	0.37	0.00	59.09	1.4E-28
1332	1	0	1	1.00	0.29	0.00	22.73	1.0E-31
Total	4	0	4				43.18	9.1E-124

Se muestra el resumen de los datos descriptivos por primer o SSR, obteniéndose así un Contenido de información polimórfica (PIC) para cada SSR.

Resultados rendimiento fase experimental

Las semillas de maíz evaluadas fueron aportadas con cooperación del CIMMYT de México y el ICTA de Guatemala, provenientes del programa de mejoramiento de maíz, entre las semillas de ICTA fueron seleccionados los controles positivo (Tolerante a estrés hídrico ICTA La Maquina 7422), y un control negativo (Susceptible a estrés hídrico ICTA HB83) según resultados de rendimiento en campo, las características de susceptibilidad o tolerancia se encuentran descritas en la tabla 6.

Tabla 9. Características de los materiales utilizados.

Código	Línea	Origen	Color/Características de semilla	Respuesta a sequía.
1	CML551=CL02720	AF13A-481-10	Amarillo cristalino	Tolerante
2	CLQR CWQ83	AF12A-481-30	Amarillo cristalino	Susceptible
3	CML549=CLRCW105	AF14A-403-1	Blanco semi-dentado	Tolerante
4	CLRCY015	AF14A-451-14	Amarillo semi-dentado	Susceptible
5	CLRCY016	AF12A-481-74	Amarillo dentado	Susceptible
6	CLWN241	AF12B-5401-9	Amarillo semi-dentado	Susceptible
7	CLWN247	AF14A-401-38	Amarillo semi-dentado	Susceptible
8	CLWN306	AF14A-401-57	Blanco semi-dentado	Susceptible
9	CLWN345	AF14A-401-97	Amarillo dentado	Susceptible
10	CLWN379	AF14A-401-112	Amarillo dentado	Susceptible
11	CLYN214	AF14A-451-77	Amarillo semi-dentado	Susceptible

12	CLYN352	AF14A-451-88	Amarillo dentado	Susceptible
13	CLYQ265	AF12B-5251-1	Amarillo dentado	Susceptible
14	CML269	AF14A-421-5	Amarillo cristalino	Susceptible
15	CML550=CLWN201	AF13A-482-6	Blanco cristalino	Tolerante
16	ICTA B1	ICTA	Blanco dentado	Susceptible
17	ICTA B7	ICTA	Blanco semi-dentado	Tolerante
18	ICTA La Maquina 7422	ICTA	Blanco semi-cristalino	Tolerante
19	ICTA B5	ICTA	Blanco cristalino	Tolerante
20	ICTA HB-83	ICTA	Amarillo cristalino	Susceptible
21	ICTA B9 (Fortificado)	ICTA	Amarillo cristalino	Susceptible
22	ICTA Maya QPM	ICTA	Amarillo cristalino-semidentado	Susceptible

Localización del experimento y condiciones climáticas:

La evaluación de los genotipos se realizó en un invernadero artesanal ubicado en Amatitlan, Guatemala (Latitud 14.479002-Longitud 90.617543), la evaluación agronómica se realizó en macetas plásticas y el suelo con el cual fueron llenadas fue proporcionado por la Finca Sabaneta ubicada en el Km 59 hacia El Progreso a 887msnm.

Tabla 10. Análisis de suelo Finca Sabaneta, El Progreso, Guatemala (Octubre 2016).

Identificación	pH	PPm		Meq/100gr			Ppm			M.O.
		P	K	Ca	Mg	Cu	Zn	Fe	Mn	
Rango medio		12-16	120-150	6-8	1.5-2.5	2-4	4-6	10-15	10-15	4.1
M-1	5.7	6.85	125	11.49	3.2	2	5	14.5	19.5	

Fuente: Laboratorio de suelos FAUSAC.

Tabla 11. Análisis de físico de suelo Finca Sabaneta, El Progreso, Guatemala (Octubre 2016).

Identificación	% Humedad (ATM)			
	1/3	2	5	15
M-1	20.59	16.68	15.85	16.48

Fuente: Laboratorio de suelos FAUSAC.

Tabla 12. Análisis de físico de suelo

Identificación	g/cc		Textura del suelo
	Da	Dr	
M-1	20.59	16.68	Arcilloso Limoso

Fuente: Laboratorio de suelos FAUSAC.

Se evaluaron los parámetros climáticos para el departamento de El Progreso tomados por la estación meteorológica del INSIVUMEH más cercana ubicada en San Agustín Acasaguastlán comprendidos entre los años 1,990-2,015, con la finalidad de la distribución de los riegos (precipitación local promedio anual de 105.52mm, y una humedad relativa promedio de 77.62%).

Manejo Agronómico

Se adicionaron 3,484.8 kg de suelo procedente de la finca Sabaneta departamento de El Progreso, Guatemala a cada maceta antes de la siembra, cada maceta fue llenada con 17.60 kg cada una, dejando 3.5 cm por debajo del borde.

Se utilizó un área de 450 m² (5m x 50m), se utilizó un distanciamiento de 0.40 m de ancho y 2.50 de largo, se sembraron tres semillas de cada genotipo por maceta, luego de 15 días de la siembra se procedió a realizar un raleo para dejar dos plantas por maceta.

Se aplicaron tres fertilizaciones la primera aplicación a los 17 días después de la siembra (dds) con fertilizante comercial granular 1,796.85g 15-15-15 de N-P-K, la segunda a los 35 dds con una mezcla química de 46-0-0 de N-P-K 1,024.65g, a los 45-50 y 55 dds se aplicaron 67.3596g de fertilización foliar en fórmula comercial 20-20-20+Elementos menores N-P-K.

Se controló *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), y *Helicoverpa zea* (gusano elotero) plagas masticadoras de follaje con un insecticida organofosforado a los 30 días dds, se

aplico de forma localizada en el cogollo de la planta se aplico 0.21g/planta (a razón de 16kg/ha), para el control de *Helicoverpa zea* se aplico un insecticida organoclorado a los 40 y 63 dds a razón de 1.5 lt/ha. Las malezas fueron eliminadas de cada maceta de manera manual.

Cosecha de las plantas

La cosecha se realizo mediante el corte y conteo de mazorcas de cada genotipo, posteriormente se colocaron en un área con buena ventilación para el secado y luego se procedió al conteo y peso de cada una, el pesaje se realizo con una balanza marca Nordika ®. En la figura 8 se muestran algunas de las mazorcas cosechadas.



Figura 11. De izquierda a derecha, mazorca genotipo HB83, ICTAB9, ICTA Maya QPM e ICTA La Maquina 7422.

En la aplicación del riego se estableció la capacidad de campo del suelo por lo que se debía tener 0% de humedad, se expusieron al sol las macetas con suelo para llevar el suelo a humedad 0% , se seleccionaron al azar 40 macetas de las 198 utilizadas y se determino su máxima capacidad agregando agua gradualmente (volumen conocido). Al final de la prueba, el suelo de cada maceta retuvo aproximadamente 2.57 lt de agua.

Se monitoreo el comportamiento de la humedad 30 días luego de la siembra, durante los primeros 30 días se agregaron 3.20lt de agua para riego (agua potable) por semana por

maceta. Se obtuvieron las variables rendimiento, altura promedio, y los índices de intensidad y susceptibilidad a sequia, para cada una de las líneas descritas en la tabla 10, el rendimiento fue obtenido del peso en gramos de las semillas por cada mazorca luego, con riego y sin riego, los índices fueron estimados mediante las ecuaciones propuestas por Fischer y Maurer en 1978.

Para determinar los índices de susceptibilidad y tolerancia a estrés hídrico se trabajo con 53 días a floración aunque el periodo de floración estuvo entre los 53 y 56 días.

Tabla 10. Peso promedio de granos de maíz por genotipo (g) evaluados y altura promedio por genotipo.

Genotipo	Rendimiento (g)	APTG (m)	Húmeda (%)	Intensidad de sequía	Susceptibilidad a Sequia
CML551=CL02720	86.57	1.79	89	0.33	0.78
CLQR CWQ83	104.59	1.98	75	0.40	0.76
CML549=CLRCW105	102.24	2.24	88	0.35	0.77
CLRCY015	46.63	2.56	91	0.40	0.76
CLRCY016	132.17	2.38	91	0.40	0.76
CLWN241	86.54	2.05	91	0.40	0.76
CLWN247	59.88	1.95	91	0.50	0.75
CLWN306	101.49	2.03	71	0.50	0.75
CLWN345	97.96	2.01	85	0.50	0.75
CLWN379	80.58	1.68	90	0.50	0.75
CLYN214	100.31	1.73	89	0.50	0.75
CLYN352	52.31	1.75	90	0.50	0.75
CLYQ265	131.62	2.10	90	0.50	0.75
CML269	112.02	2.09	88	0.50	0.75
CML550=CLWN201	194.41	2.28	90	0.50	0.75
ICTA B1	150.56	2.30	90	0.50	0.75
ICTA B7	122.25	2.15	87	0.50	0.75
ICTA La Maquina 7422	155.77	2.40	91	0.40	0.76
ICTA B5	103.85	2.10	88	0.40	0.76
ICTA HB-83	12.02	1.62	88	0.40	0.76
ICTA B9 (Fortificado)	119.13	2.09	75	0.40	0.76
ICTA Maya QPM	118.31	2.38	84	0.40	0.76

*APTG= Altura promedio por genotipo.

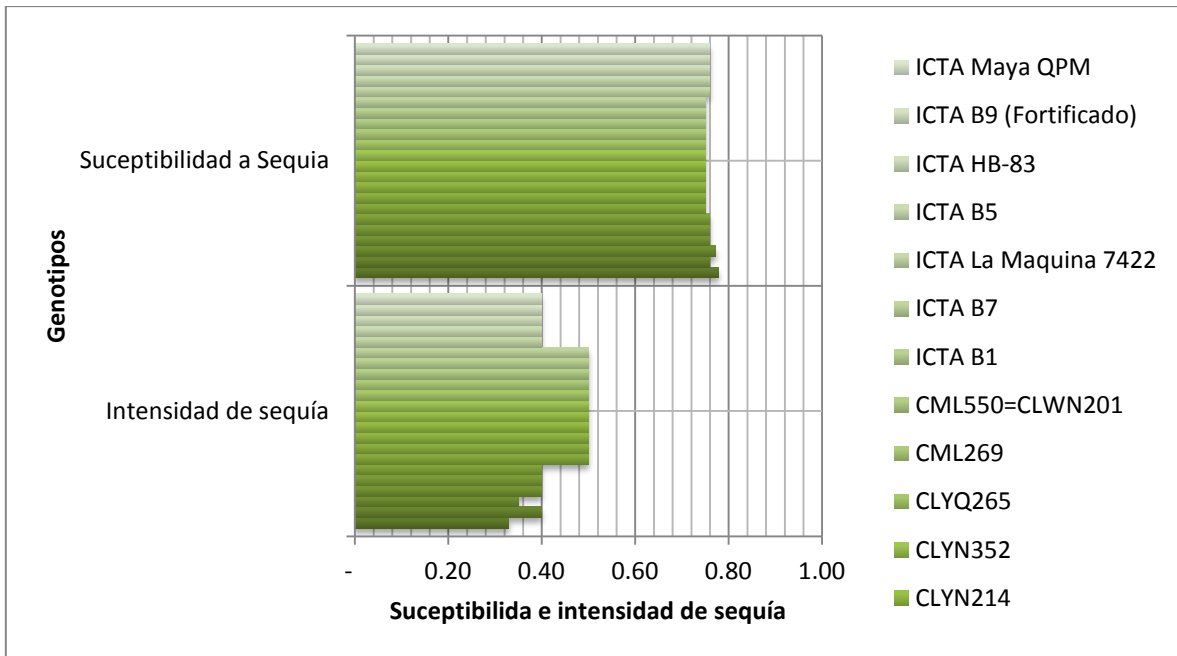


Figura 12: Susceptibilidad e intensidad de sequia por genotipo.

Discusión de resultados

La siembra in vitro fue utilizada para la germinación de semillas de maíz las cuales fueron posteriormente utilizadas para la extracción de ADN y para la germinación de las semillas y su posterior salida a la fase de invernadero, con esto se garantizo el tener material joven para la extracción ya que al germinar las semillas contenían mayor cantidad de células jóvenes (CYMMIT, 2006), resultado necesario sembrar in vitro para luego sacar las plántulas a la prueba a sequia, ya que de esta manera se garantizo homogeneidad en la altura de las planas al momento de la siembra y la seguridad de que las plantas se encontraran en un ambiente estéril por lo tanto estuvieron al momento de la siembra libres de fitopatógenos (Graciano, Vargas, 2005).

La selección de material genético se realizo en base a sus características filogenéticas, a la producción de mazorcas y a la capacidad de producción en situaciones de estrés hídrico (Inventario Centroamericano de Tecnologías de Maíz y Frijol, 2016, CIMMYT, 2013).

Los microsatélites (SSR por sus siglas en ingles) fueron seleccionados para estimar los niveles de variabilidad genética dentro de poblaciones y analizar las relaciones genéticas

existentes entre las mismas (Aranguren, Bravo, R., Isea, W., y Villasmil, J.J., 2004). Se trabajó con 20 pares de SSR (Tabla 3) de la colección general de el laboratorio de diversidad genética de maíz del CIMMYT, ya que estos fueron probados en otros estudios presentando polimorfismos en especies de maíz para diversos germoplasmas y como se observa en las figuras 6-7 el patrón de bandas fue identificable y claro en los SSR que resultaron positivos en la amplificación (Gonzalo, C. 2013).

En cuanto a la diversidad genética el SSR umc1332 fue el que presentó menor diversidad genética con un 8.3, y el de mayor diversidad genética el SSR phi84 con 44.7%, en su mayoría fueron polimórficos destacando 2 alelos por locus, lo que los incluye en un solo germoplasma. En la prueba de Friderman para el número de alelos todos los genotipos resultaron con valor p mayor a 0.05, lo que indica que no son significativamente diferentes entre sí, por lo tanto la heterocigocis para cada genotipo no fue diferente, lo que indica que los alelos del mismo locus en cromosomas homólogos son diferentes (Allard, 1980).

Según el contenido de información polimórfica se muestra nuevamente que el que presenta menor polimorfismo en el SSR umc1332, mientras los marcadores phi29, 63 y 84 presentan un polimorfismo similar.

Entre los genotipos evaluados algunos se mencionaron como susceptibles o tolerantes según sus descriptores (tabla 6), los tolerantes según el descriptor fueron CML551-549-550, ICTA B7, ICTA La Maquina 7422, ICTA B5 sin embargo, en condiciones de sequía en base al rendimiento ICTA La Maquina 7422 fue el que tuvo los mejores rendimientos con 15,576.75 kg/ha, el mayor número de granos por mazorca, y el susceptible fue el ICTA HB83 con un rendimiento de 1,201.75kg/ha. Los otros genotipos presentaron rendimientos iguales o mayores a la media de la población, lo que indica que estos genotipos se deben reevaluar en cuanto a su nivel de tolerancia a sequía, ya que en este trabajo hemos identificado estos genotipos como medianamente tolerantes a estrés hídrico debido a que todos se encuentran en el rango de 75-76% en susceptibilidad a sequía, lo que deja un 24% de tolerancia, estimación muy baja para clasificar a los genotipos como tolerantes.

En cuanto al rendimiento la sequía la polinización es una la etapa extremadamente sensitiva al efecto que puedan causar las variantes ambientales una de ellas la sequía, que afectando negativamente al rendimiento (Fuentes, 2002).

Doorembos y Kassam, 1979 dicen que el cultivo de maíz requiere de 500-800 mm para completar su ciclo de vida (dependiendo del clima), comparado con Fuentes (2002) quien menciona que el maíz necesita de 500-700 mm de precipitación, durante el ciclo de cultivo. Sin embargo características del suelo condicionan la cantidad de agua que debe aplicarse para cumplir con un requerimiento promedio de 625 mm de agua en el ciclo fenológico del cultivo ya que si la humedad no puede ser almacenada en el suelo no existirá absorción por parte de la planta condicionando su rendimiento, la precipitación promedio anual para el departamento de El Progreso, Guatemala es de 105.52 mm de lluvia por lo tanto es necesario realizar aplicaciones de riego para completar el requerimiento hídrico del cultivo de maíz.

En general, el cultivo de maíz dispone de una fase crítica que demanda la mayor cantidad de agua, éste período ocurre durante la fase de pre y post floración (Fuentes, 2002), al no cumplir con la demanda hídrica se condiciona al rendimiento, los genes que proporcionan la tolerancia a sequia han sido estudios únicamente en base al mejoramiento convencional el cual consiste en la selección fenotípica de cualidades de interés en el momento de la cosecha, un estudio a nivel molecular como por ejemplo la secuenciación no ha sido trabajado aún sin embargo la amplificación de los marcadores hace referencia a que pueden ser utilizados los marcadores tipo SSR umc 1332, phi 29, 63 y 84, según lo observado en la prueba de invernadero todos los genotipos evaluados presentaron altos índices de susceptibilidad a sequia aunque uno de los genotipos específicamente el ICTA La Maquina 7422 presento un muy buen rendimiento y una amplificación positiva con los marcadores phi 29, 63 y 84 debido a que sus posiciones en el genoma se observan a distancias similares (figura 8).

12. Conclusiones

- -El genotipo ICTA La maquina 7422 fue el que presento el mejor rendimiento en condiciones de sequia basado en la capacidad de producción de mazorcas.
- -Los marcadores microsatélites amplificados para los 22 genotipos únicamente fueron los phi029, 63, 84 y el umc 1332, sin embargo únicamente para el genotipo ICTA La Maquina 7422 presentaron coincidencias en la amplificación los microsatélites phi029, 063 y 084 pudiendo estar asociados al mejor rendimiento en condiciones de estrés hídrico ya que phi29 y phi 84 son los que presentaron una amplificación, sus índices de tolerancia al estrés hídrico o sequia es demasiado elevado del 76%,
- Todas las muestras presentan una alta diversidad genética debido a que las líneas no fueron líneas puras.

13. Referencias

1. Allard R.W. (1980). Principios de la Mejora Genética de las Plantas New York.
2. Aranguren-Méndez, J.A., Román-Bravo, R., Isea, W., y Villasmil, J.J. (2004). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal, 13:1-14.
3. Brown, A. and B. Weir (1983). "Measuring genetic variability in plant populations." Isozymes in Plant Genetics and Breeding: 219-239.
4. Cardona Orellana, Jorge A. 2014. Recomendaciones técnicas para el cultivo de maíz para zonas de producción comprendidas entre 0 a 1400msnm. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA).
5. CIMMYT, (2006) Protocolos de laboratorio. Laboratorio de genética molecular aplicada de CIMMYT. 3a. ed. El Batán, Texcoco México. 92p.
6. CIMMYT, (2013). El CIMMYT lanza 22 líneas endogámicas o puras de maíz para el trópico y el sub trópico. Recuperado el 15 de junio 2016. De <http://www.cimmyt.org/es/el-cimmyt-lanza-22-lineas-endogamicas-o-puras-de-maiz-para-el-tropico-y-el-subtropico/>.
7. Doorembos, JK.; Kassam, AH. (1979). Efecto del agua sobre el rendimiento de los cultivos. Roma, FAO. 212 p. (Serie Riego y Drenaje no. 33).

8. Dr. Graciano Calva Calva, Dra. Josefina Pérez Vargas. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro. Revista Digital Universitaria, Volumen 6 Número 11, 16.
9. Ellegren, H. 2,004. "Microsatellites: simple sequences with complex evolution." *Genetics* **5**: 435 - 445.
10. Fuentes L. 2002. EL cultivo de maíz en Guatemala una guía para su manejo agronómico. Instituto de Ciencias y Tecnología Agrícolas (ICTA).
11. Ferreira, M. E., D. Grattapaglia 1,998). "Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético 1ª ed." Brasilia, Embrapa – Cenargen: 220
12. Fischer, R. A., y R. Maurer. 1,978. Drought resistance in spring wheat cultivars. I: Grain yield responses. *Aust. J. Agric. Res.* 29 (5): 897-912.
13. Gonzalo, C., Palacios Rojas, N., Espinoza, Bedoya. (2013). Diversidad genética en maíces nativos mexicanos tropicales. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol.36. Supl. 3-A: 329-328
14. Inventario Centroamericano de Tecnologías de Maiz y Frijol. Recuperado 20 de junio de 2016. De <http://observatoriodesicta.info/inventariotec/variedades/maiz.html>
15. Konrad, B. 1,994. "Tansley Review No. 63." *Molecular Markers in Plant Ecology.* *New Phytologist* **Vol. 126**(No 3): 403 - 418.
16. Luna-Flores, W., Estrada-Medina, H., Jiménez-Osornio, J. J. M. & Pinzón-López , L. L. (2012). Efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento y eficiencia del uso del agua en plántulas de tres especies arbóreas caducifolias. *Terra*

Latinoamericana, 30(4) 343-353. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?Id=57325814006>.

17. Maselli, S., Cobaqui, R., (2008) Segundo Informe Nacional sobre el estado de los Recursos Fitogenéticos de Guatemala (FAO /GCP/GLO/190/SPA), Diciembre 2008. Guatemala, CA: LitoArt. recuperado de <http://www.fao.org/pgrfa-gpa-archive/gtm/pdfs/guatemala2.pdf>
18. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAGA). (2016). Situación del Maíz Blanco. Recuperado de <http://web.maga.gob.gt/download/info-maíz-b-jun.pdf>.
19. Muñoz, G. (5 de febrero 2015). SESAN: 266 mil familias están en riesgo alimentario. Siglo 21. Recuperado de <http://www.s21.com.gt/nacionales/2015/02/05/sesan-266-mil-familias-estan-riesgo-alimentario>.
20. Orozco C., Sagastume H., Feldhoff, U., Succini, A., y Cruz M. (2013). Propagación in vitro de tres especies del genero Tillandsia en vías de extinción y de potencial uso sustentable Revista Tikalia Vol. XXXI No. 1. Recuperado desde: <http://www.revistasguatemala.usac.edu.gt/index.php/Tikalia/article/view/106/85>.
21. Preciado Ore, Montes. 2011. Reseña del libro “Amplitud mejoramiento, usos y riesgo de la diversidad genética de maíz en México. Rev. Fitototec. México. No. 4
22. Paliwal, R., Granados, G, Lafitte, H., Violic A., Marathée, P., (2001) El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma, Italia. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/003/X7650S/x7650s00.htm>.
23. Reif J C, M L Warburton, X C Xia, D A Hoisington, J Crossa, S Taba, J Muminović, M Bohn, M Frisch, A E Melchinger . 2006. Grouping of accessions of

- Mexican races of maize revisited with SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 113:177-85.
24. Rodríguez, M., y Arencibia, A. (2002). Principales tipos de marcadores del polimorfismo de los ácidos nucleídos. En: M.T. Cornide-Hernandez (Ed.). *Marcadores Moleculares: Nuevos horizontes en la genética y la selección de plantas* (pp. 13-35). La Habana: Félix Varela Ediciones.
25. Sandoval Illescas, JE. 1989. Principios de riego y drenaje: texto de curso de principios de riego y drenaje. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 344
26. Secretaría de Seguridad Alimentaria y Nutricional (SESAN). (Febrero 2013). Resumen ejecutivo impacto de la canícula prolongada en la población de infra y subsistencia del corredor seco de Guatemala. Recuperado de http://home.wfp.org/stellent/groups/public/documents/liaison_offices/wfp255380.pdf
27. Sponchiado, B. N. (1985). Avaliação do sistema radicular do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) como un mecanismo de tolerancia al déficit hídrico. Pelotas, Universidad de Federal de Pelotas. **Tesis (M.Sc.):** 150.
28. 12. Vigouroux Y, J C Glaubitz, Y Matsuoka, M M Goodman, J Sánchez, J Doebley. (2,008). Population structure and genetic diversity of new world maize races assessed by DNA microsatellites. *Amer. J. Bot.* 95:1240-1253.
29. Vigouroux Y, M McMullen, C T Hittinger, K Houchins, L Schulz, S Kresovich, Y Matsuoka, J Doebley. (2002). Identifying genes of agronomic importance in maize by screening microsatellites for evidence of selection during domestication. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99:9650-9655.

30. Westermeier R (2001): "Electrophoresis in Practise", 3^a ed. WILEY-VCH Verlag GmbH (Weinheim, Alemania). Recuperado de <https://www.uco.es/ciencias/lbiologia/planificacion/documentos/.../3374.pdf>.

31. Wellhausen, E.J., Fuentes O., A., Hernández Corzo, A. and Mangelsdorf, P.C. (1957). Races of maize in Central America. Academy of Sciences, National Research Council, Washington, DC, USA.

32. Wilches, A., (2004). Descripción de las herramientas moleculares y sus aplicaciones en la agricultura. Guatemala: Universidad Rafael Landívar, Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente. Serie técnica No. 15. Recuperado de <http://biblio3.url.edu.gt/IARNA/SERIETECNINCA/15.PDF>

Anexos

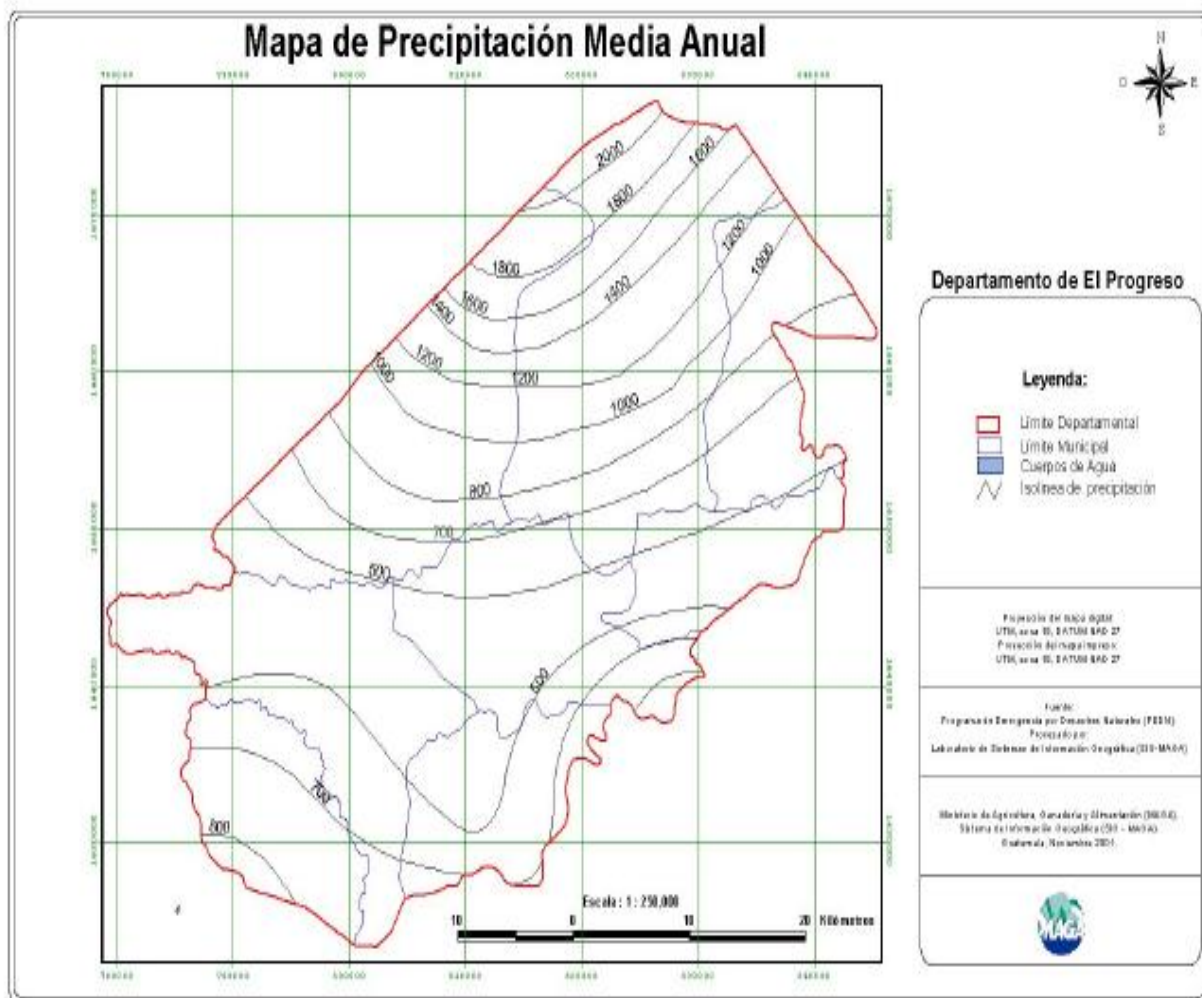


Figura 13 : Mapa de precipitación media anual del el progreso departamento de El Progreso Guatemala.

Fuente: MAGA - SIG (2001b).

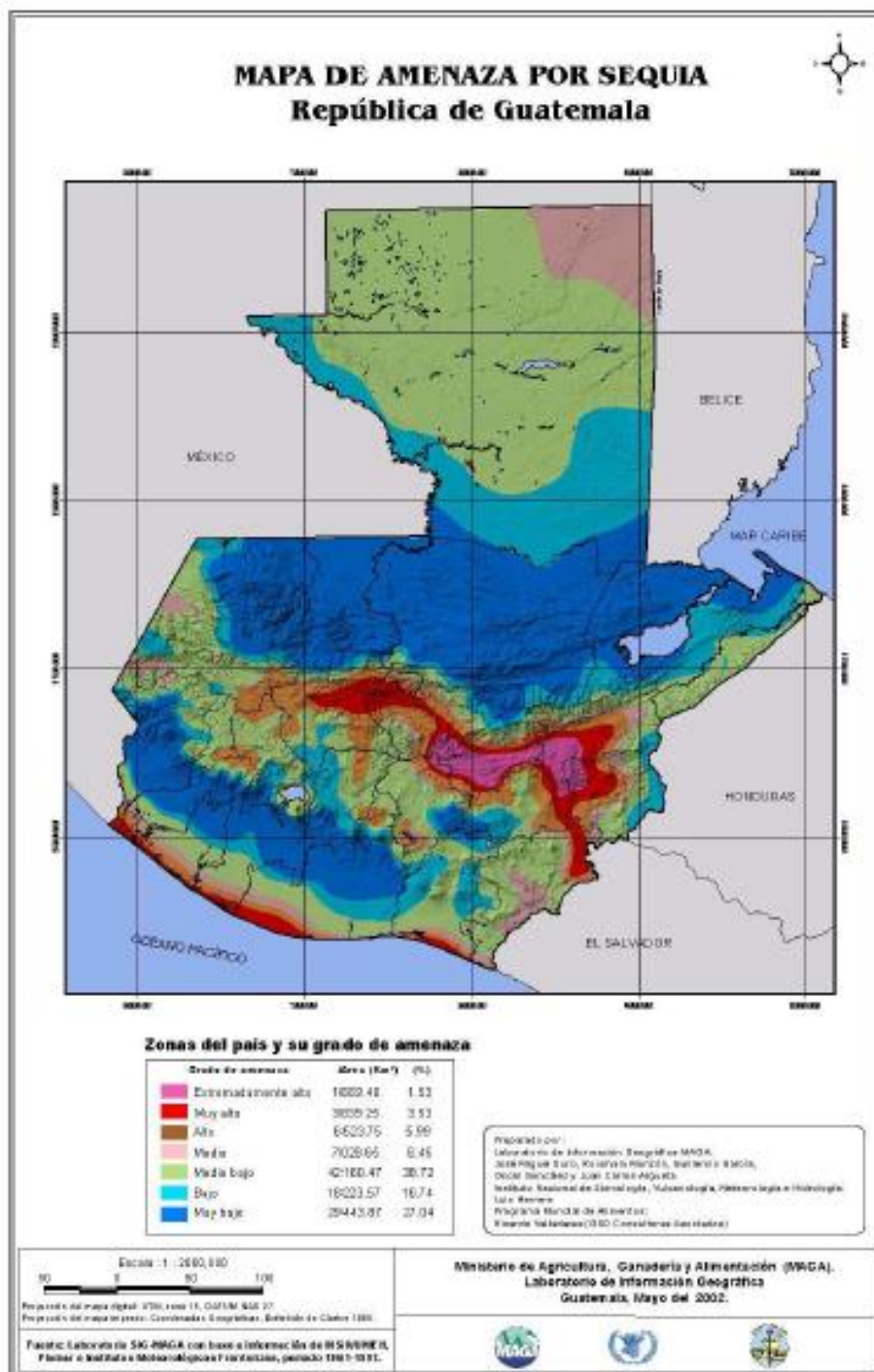


Figura 14 . Mapa de amenaza por sequía, para la república de Guatemala. Fuente: MAGA (2003).



Figura 15. Repeticiones en fase de invernadero por cada genotipo