

Aproximación al estudio de la respuesta hipersensible en plantas empleando líneas mutantes LMM de maíz

Proyecto Final de Máster en Biotecnología Avanzada

Ana Fandiño Carro



Universidade de Vigo



Proyecto Final de Máster en Biotecnología Avanzada titulado “Aproximación al estudio de la respuesta hipersensible en plantas empleando líneas mutantes LMM de maíz” realizado por Ana Fandiño Carro en el Instituto Galego da Calidade Alimentaria-Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (INGACAL-CIAM) bajo la tutoría de la Doctora Ana Belén Monteagudo Diz durante los meses de septiembre a diciembre de 2011.

Universidad de A Coruña (curso 2011-2012).

A Coruña, 30 de enero de 2012.

Alumna:

Ana Fandiño Carro

Licenciada en Biología.

Coordinadores del Máster:

Dr. Manuel Becerra Fernández.

Departamento de Biología Celular y Molecular.

Universidad de A Coruña.

Dra. M^a Ángeles Sanromán Braga.

Departamento de Ingeniería Química.

Universidad de Vigo.

Dra. M^a Carmen Veiga Barbazán.

Departamento de Ingeniería Química.

Universidad de A Coruña.

Dra. Carmen Sieiro Vázquez.

Departamento de Biología Funcional y

Ciencias de la Salud.

Universidad de Vigo.

Tutora:

Dra. Ana Belén Monteagudo Diz.

Laboratorio de Biotecnología.

Instituto Galego da Calidade Alimentaria (INGACAL).

Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM).

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	pág. 1
1.1. Respuesta hipersensible y resistencia a enfermedades	pág. 2
1.2. Los genes de defensa de la planta	pág. 4
1.2.1. Los genes <i>PR</i>	pág. 5
1.2.2. Los genes <i>HIR</i>	pág. 6
1.3. Los mutantes lesionados	pág. 8
1.4. Análisis genotípico mediante marcadores moleculares	pág. 9
1.5. Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR	pág. 10
2. OBJETIVOS	pág. 12
3. MATERIAL Y MÉTODOS	pág. 12
3.1. Material vegetal	pág. 12
3.2. Estudio con marcadores moleculares	pág. 14
3.2.1. Selección de los marcadores microsatélite	pág. 14
3.2.2. Extracción de ADN	pág. 14
3.2.3. Amplificación de fragmentos SSR mediante PCR	pág. 15
3.2.3.1. Electroforesis en gel de agarosa	pág. 16
3.2.4. Análisis de los fragmentos en secuenciador automático	pág. 16
3.3. Estudio de la expresión génica de genes de respuesta a enfermedades	pág. 18
3.3.1. Extracción y purificación de ARN	pág. 18
3.3.1.1. Extracción con fenol-cloroformo	pág. 18
3.3.1.2. Purificación	pág. 19
3.3.2. Diseño de primers	pág. 19
3.3.3. Síntesis de ADNc mediante RT-PCR	pág. 20
3.3.4. Análisis de la expresión génica mediante qPCR	pág. 20
3.4. Análisis estadístico	pág. 21
3.4.1. Análisis de la variabilidad genética	pág. 21
3.4.2. Análisis cluster	pág. 22

4. RESULTADOS	pág. 23
4.1. Amplificación fragmentos SSR mediante PCR	pág. 23
4.2. Estudio de la expresión génica	pág. 25
4.3. Análisis cluster	pág. 28
5. DISCUSIÓN	pág. 29
6. CONCLUSIONES	pág. 33
7. REFERENCIAS	pág. 34
Anexo 1	pág. 39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las familias de proteínas PR y sus principales propiedades.	Pág. 5
Tabla 2. Descripción de las líneas de mutantes LMM de maíz utilizadas en el estudio.	Pág. 12
Tabla 3. Posibles posiciones cromosómicas de los genes del proyecto y SSRs asociados (colección del CIAM).	Pág. 14
Tabla 4. Condiciones de la amplificación por PCR.	Pág. 16
Tabla 5. Características de los primers seleccionados.	Pág. 19
Tabla 6. Condiciones de PCR en Tiempo Real.	Pág. 21
Tabla 7. Alelos SSR obtenidos para las diferentes líneas y valor PIC de cada marcador.	Pág. 24
Tabla 8. Alelos específicos para las líneas de maíz estudiadas.	Pág. 25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo simplista de las rutas de transducción de señal que conducen a la RH.	Pág. 3
Figura 2. Dendrograma que muestra las relaciones entre 32 miembros de la superfamilia PID y su división en 4 superfamilias.	Pag. 7
Figura 3. Fenotipos de los mutantes lesionados.	Pág. 13
Figura 4. Esquema de un secuenciador automático ABI Prism 310 Genetic Analyzer.	Pág. 17
Figura 5. Fotografía de un secuenciador automático GeXP.	Pág. 18
Figura 6. Electroferograma del marcador SSR umc2281, realizado en el secuenciador automático GeXP (Beckman Coulter, USA), en 4 líneas de maíz.	Pág. 23
Figura 7. Datos de qRT-PCR de los genes <i>HIR1</i> , <i>HIR2</i> , <i>HIR3</i> , <i>PR-1</i> y <i>PR-5</i> , de cada una de las líneas estudiadas.	Pág. 26

Figura 8. Dendrograma resultante del análisis cluster de 10 líneas de maíz con 30 marcadores microsatélite y 9 marcadores de expresión, obtenidos por el método UPGMA y utilizando el estadístico de Nei (1972) como estimador de las distancias genéticas entre grupos. Pág. 28

Figura 9. Dendrograma resultante del análisis cluster de 10 líneas de maíz con 9 marcadores de expresión, obtenidos por el método UPGMA y utilizando el estadístico de Nei (1972) como estimador de las distancias genéticas entre grupos. Pág. 29

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Secuencias de los primers de los marcadores SSR utilizados en el estudio y algunas de sus características. Pág. 39

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABA: Ácido abscísico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ADNds: Ácido desoxirribonucleico de doble cadena

AFLP: De las siglas en inglés *Amplified Fragment Length Polymorphism*, polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

CCD: De las siglas en inglés *Charge-Coupled Device*, dispositivo de carga acoplada

CIAM: Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo

cm: Centímetro

Ct: De las siglas en inglés *Threshold Cycle*, ciclo umbral

CTAB: De las siglas en inglés *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*, Bromuro de cetiltrimetilamonio

EDTA: De las siglas en inglés *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*, ácido etilendiaminotetraacético

EST: De las siglas en inglés *Expressed sequence tag*, marcador de secuencias expresadas

Et: Etileno

FC: De las siglas en inglés *Fold Change*, número de veces de cambio

g: gramo

GADPH: gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa

Genes DR: genes de respuesta de defensa

Genes R: genes de resistencia

h: hora

He: Heterocigosidad esperada

HIR: De las siglas en inglés *Hypersensitive-induced reaction protein*, proteínas inductoras de la respuesta hipersensible

Ho: Heterocigosidad observada

ISR: De las siglas en inglés *Induced Systemic Resistance*, resistencia sistémica inducida

JA: De las siglas en inglés *Jasmonic Acid*, ácido jasmónico

LMM: De las siglas en inglés *Lesion Mimic Mutant*, mutante lesionado

LRR: De las siglas en inglés *Leucine-Rich Repeat proteins*, proteínas con repeticiones ricas en leucina

M: Molar

MaizeGDB: *Maize genomics and Genetics Database*

MAS: De las siglas en inglés *Marker Assisted Selection*, selección asistida por marcadores moleculares.

mg: Miligramo

MGCSC: *Maize Genetics Cooperation Stock Center*

min: Minutos

ml: Mililitro

μl: Microlitro

mM: Milimolar

NJ: De las siglas en inglés Neighbor-Joining, método del vecino más cercano

nm: Nanómetro

°C: Grado centígrado

pb: pares de bases

PCD: De las siglas en inglés *Programmed Cell Death*, muerte celular programada

PCR: De las siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa

PIC: De las siglas en inglés *Polymorphic Information Content*, contenido de información polimórfica.

PID: De las siglas en inglés *Proliferation, Ion and Death*; superfamilia de proteínas relacionadas con funciones de proliferación celular, transporte de iones y muerte.

PR: De las siglas en inglés *Pathogenesis-Related proteins*, proteínas relacionadas con la patogenicidad

PVP: Polivinilpirrolidona

qPCR: De las siglas en inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real

qRT-PCR: De las siglas en inglés *quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*, transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

QTL: De las siglas en inglés *Quantitative Trait Loci*, loci de características cuantitativas

RAPDs: De las siglas en inglés *Random Amplified Polymorphic DNAs*, Polimorfismos de ADN amplificados al azar

RFLP: De las siglas en inglés *Restriction Fragment Length Polymorphisms*, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

RH: Respuesta hipersensible

RNasa: Ribonucleasa

ROX: Especies reactivas de oxígeno

rpm: Revoluciones por minuto

RT-PCR: De las siglas en inglés *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

s: Segundos

SA: De las siglas en inglés *Salicylic Acid*, ácido salicílico

SAR: De las siglas en inglés *Systemic Acquired Resistance*, resistencia sistémica adquirida

SLS: De las siglas en inglés *Sample Loading Solution*, solución de carga de la muestra

SNPs: De las siglas en inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*, polimorfismos de un solo nucleótido

SPFH: De las siglas en inglés Stomatins, Prohibitins, Flotillins, HflK/C; dominio característico de las estomatinas, prohibitinas, flotilinas y proteínas HflK/C de algunas bacterias y virus.

SSRs: De las siglas en inglés *Simple Sequence Repeats*, repeticiones de secuencia simple, microsátélites

STS: De las siglas en inglés *Sequence Tagged Sites*, sitios de secuencias etiquetadas

TAE: Tris-Acetato EDTA

TE: Tampón de extracción

TLP: De las siglas en inglés *Thaumatococcus digyna*, proteínas tipo taumatina

T^{ra}: Temperatura

UPGMA: De las siglas en inglés *Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*, método de agrupamiento de pares usando la media aritmética no ponderada

USA: De las siglas en inglés *United States of America*, Estados Unidos de América

UV: Ultravioleta

V: Voltios

λ : Longitud de onda

AGRADECIMIENTOS

A Ana Monteagudo, mi tutora, por darme la oportunidad de aprender y conocer el mundo de la biotecnología y la mejora genética vegetal; además por su paciencia, buen humor e incansable ayuda.

A los coordinadores del Máster, en especial a Manuel Becerra y M^a Carmen Veiga.

A mis compañeros del CIAM, por los buenos momentos, las agradables conversaciones y las risas en la hora del café.

A mis compañeros del Máster, del que me llevo buenos amigos.

A mis padres, mis hermanas y a Roberto por aguantarme mientras escribía este trabajo.

RESUMEN

Las plantas están constantemente expuestas al ataque de patógenos y plagas, que afectan a la productividad de los cultivos y ocasionan grandes pérdidas económicas. Actualmente, se están desarrollando técnicas de control alternativas a los pesticidas, basadas en el aumento de la resistencia mediante mejora genética, debido a los riesgos para la salud y el medio ambiente que implica el uso de estos compuestos químicos. Sin embargo, a día de hoy, sólo se conoce parte de los mecanismos de respuesta de defensa que confieren resistencia a las plantas. Se ha demostrado que los LMMs (*Lesion Mimic Mutants*) son unas herramientas valiosas para la identificación de los genes que intervienen en la regulación y ejecución de la muerte celular programada (PCD), particularmente de la respuesta hipersensible (RH), y en las rutas de resistencia a patógenos en plantas.

El objetivo de este estudio fue comparar la línea mutante L8 del CIAM con 8 líneas mutantes procedentes del Maize Genetics Cooperation Stock Center (MGCSC) de la Universidad de Illinois-USA, que producen distintas lesiones en el maíz y cuyas mutaciones se conocen y están bien caracterizadas. La comparación entre líneas se centró en el estudio de las diferencias de los niveles de expresión génica, mediante qRT-PCR, y de marcadores microsatélite, mediante PCR y posterior separación de fragmentos en secuenciador automático, para 3 genes de respuesta hipersensible (*Zm-hir1*, *Zm-hir2* y *Zm-hir3*) y 2 genes de respuesta de patogenicidad (*PR1* y *PR5*).

De los 41 marcadores SSR seleccionados, sólo 27 resultaron polimórficos. A pesar de que no se encontraron diferencias significativas entre líneas en base a los SSRs, se obtuvieron marcadores específicos que podrían ser de utilidad en la diferenciación de líneas, para su aplicación en selección asistida por marcadores (MAS) y caracterización de germoplasma de maíz. Además, el *bin* 7,03, asociado al gen *Zm-hir2*, fue muy significativo, indicando la existencia de diferencias a nivel de secuencia entre mutantes y el fenotipo silvestre en esta región. Por otra parte, los resultados obtenidos a partir de los marcadores de expresión sugieren que los mutantes presentan alteraciones en reguladores de los genes estudiados.

El estudio realizado contribuye al conocimiento de la estructura genética de las líneas de maíz estudiadas, constituyendo una base de partida para el diseño de futuras investigaciones.

1. INTRODUCCIÓN

El maíz ocupa una posición de gran importancia en la agricultura, siendo uno de los tres alimentos básicos a nivel mundial, junto con el arroz y el trigo (Morris *et al.*, 1998; Muthukrishnan *et al.*, 2001; Prasanna y Hoisington, 2003). La mayor parte de la producción mundial de maíz se destina a la alimentación animal, mientras que en algunos países se emplea para la alimentación humana en cantidades significativas. Además constituye una importante fuente de materia prima para la obtención de almidón y derivados, como edulcorantes, aceite y alcohol, que son utilizados en la industria química o en la producción de biocombustibles (Schlatter *et al.*, 2004).

A pesar de su importancia, la productividad del maíz en muchos países desarrollados todavía se considera baja, esperándose que su demanda en el año 2020 sobrepase a la del trigo y el arroz juntos (Prasanna y Hoisington, 2003). Además, la productividad del cultivo está continuamente en riesgo debido a las numerosas enfermedades y plagas que afectan a la viabilidad de las plantas o reducen su rendimiento, suponiendo unas pérdidas anuales de cientos de millones de toneladas (Morris *et al.*, 1998; Muthukrishnan *et al.*, 2001). Aunque los pesticidas e insecticidas hasta el momento han servido para mitigar estas pérdidas, existe la necesidad de buscar nuevas alternativas de control, por los riesgos para la salud y medioambiente que implica su uso (Muthukrishnan *et al.*, 2001).

El desarrollo de líneas resistentes es una estrategia efectiva y segura desde el punto de vista ambiental, previniendo la aparición de epidemias y eliminando o reduciendo el uso de productos fitosanitarios necesarios para su control (Morris *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999). Los programas de mejora tradicionales resultan lentos y tediosos para la obtención de variedades y líneas mejoradas, por lo que el empleo de herramientas moleculares junto con la mejora clásica acelera sensiblemente el proceso (Salleres, 2010). Sin embargo, el conocimiento en profundidad de los mecanismos implicados en la resistencia es un requisito previo necesario para la obtención de cultivos resistentes.

La comprensión de los mecanismos de respuesta de defensa de las plantas continúa siendo un reto debido a su complejidad. La localización por mapeo genético, la caracterización de secuencias y el estudio de los patrones de expresión de los genes de defensa podría ayudar a esclarecer dichos mecanismos (Rostocks *et al.*, 2003). Otra aproximación, se basa en el estudio de plantas mutantes que desarrollan lesiones tipo respuesta hipersensible (RH) en ausencia de patógenos, produciéndose espontáneamente la muerte celular programada (PDC) de sus tejidos y

la expresión constitutiva de las respuestas de defensa. Estos mutantes se conocen como mutantes lesionados o imitadores de lesión (*Lesion Mimic Mutants- LMM*) y son usados como modelos para el entendimiento de las rutas de resistencia a enfermedades, la PDC y la RH en plantas (Johal *et al.*, 1995; Bouchez *et al.*, 2007).

1.1. RESPUESTA HIPERSENSIBLE Y RESISTENCIA A ENFERMEDADES

Las plantas están constantemente expuestas a numerosos patógenos con diferentes modos de invasión. Sin embargo, la presencia de un sistema de defensa eficaz e inducible evita que esta exposición a patógenos se traduzca en una infección real en la mayoría de las ocasiones (Chintamanani *et al.*, 2010).

A lo largo de su evolución, las plantas han desarrollado diferentes estrategias para la defensa, que van desde mecanismos físicos (celulosa, lignina) y químicos (taninos, fenoles), hasta sofisticadas cascadas de señalización intra- e intercelulares, que activan sistemas de respuesta, tanto local como sistémica, durante una infección (Dietrich *et al.*, 1994; Muthukrishnan *et al.*, 2001). Estas respuestas inducibles incluyen la formación de metabolitos secundarios (fitoalexinas), especies reactivas de oxígeno (ROX), óxido nítrico, hormonas (ácido salicílico -SA, ácido jasmónico-JA, etileno), diversos componentes de la pared celular (calosa, glicina y proteínas ricas en hidroxiprolina) y otro grupo de proteínas relacionadas con la patogenicidad (proteínas PR) (Muthukrishnan *et al.*, 2001; Bouchez *et al.*, 2007).

La RH es una forma de muerte celular programada que con frecuencia se asocia a la resistencia de las plantas frente a la infección por patógenos, limitando el crecimiento de los mismos e impidiendo la extensión de la infección (Morel *et al.*, 1997). Está desencadenada por el reconocimiento específico de moléculas asociadas a los patógenos (Avr), seguida por la activación inespecífica de diversas cascadas de transducción de señal, que conducen la biosíntesis de efectores que bloquean el crecimiento del patógeno (Figura 1). Estos eventos dan lugar a un cúmulo de respuestas, codificadas por los genes de resistencia de la planta (Dietrich *et al.*, 1994; Rostocks *et al.*, 2003), que se caracterizan por el enriquecimiento de la pared celular, el aumento de la actividad oxidativa y la necrosis alrededor del lugar de infección (Zhou *et al.*, 2010).

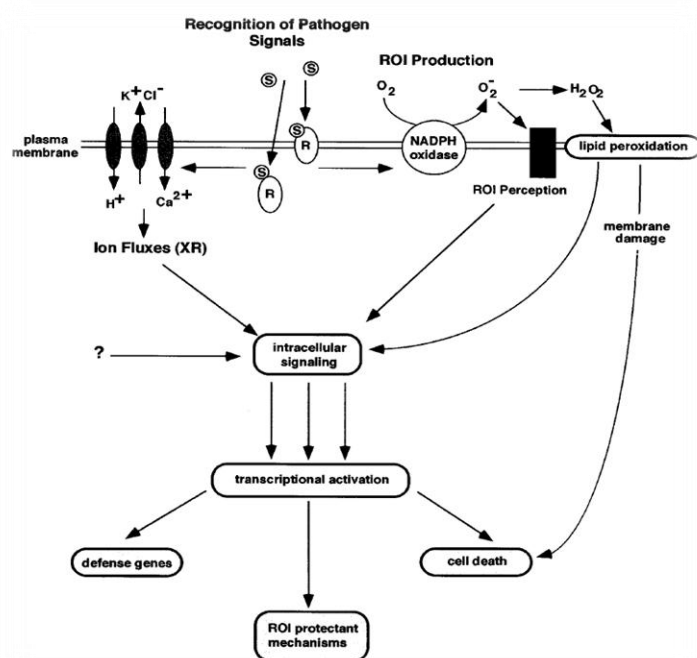


Figura 1. Modelo simplista de las rutas de transducción de señal que conducen a la RH. Después del reconocimiento inicial de la señal del patógeno (S) vía receptor extra- o intracelular (R; producto de un gen R de la planta o receptor de un inductor), tiene lugar una explosión oxidativa y un flujo de iones (XR) que desencadena una cascada de señalización intracelular y la activación de las respuestas de defensa (activación de genes, muerte celular y mecanismos de protección celular). Fuente: Morel *et al.*, 1997.

La RH actúa provocando el flujo intracelular de calcio, la disfunción de la membrana plasmática y el aumento de la generación de especies ROX (Rostocks *et al.*, 2003), causando la muerte, no sólo del patógeno (hongo, virus o bacteria), sino también de las células de la propia planta, dando lugar a la aparición de lesiones. Estas lesiones pueden desarrollarse en ausencia de patógenos en el caso de los **mutantes lesionados** o LMM (*Lesion Mimic Mutants-LMM*), debido a que poseen mutaciones que se traducen en la sobreexpresión de los genes relacionados con la defensa (Zhou *et al.*, 2010).

La RH es seguida por una respuesta secundaria, conocida como resistencia sistémica adquirida (SAR) (Dietrich *et al.*, 1994; Morris *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2007). La SAR es un sistema de defensa de la planta que confiere resistencia a enfermedades de amplio espectro, a niveles más altos y prolongados, y está acompañada de la expresión coordinada de los llamados genes SAR (Morel *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 1998). Se ha visto que algunos productos de estos genes tienen actividad antimicrobiana directa. Además, se ha demostrado que determinados compuestos químicos, entre ellos el SA, son capaces de inducir los genes SAR y la resistencia a patógenos (Dietrich *et al.*, 1994).

1.2. LOS GENES DE DEFENSA DE LA PLANTA

La utilización de la resistencia del hospedador es uno de los métodos de control de plagas más efectivo y respetuoso con el medio ambiente (Li *et al.*, 1999). Al igual que la mayoría de los caracteres de interés agrícola, la resistencia generalmente es un carácter que tiene base poligénica (carácter determinado por más de un gen o carácter cuantitativo). Esto dificulta el estudio de estos genes, pues no presentan herencia mendeliana y no se puede diferenciar los efectos de los genes individuales (Cubero, 1999).

Se ha demostrado, mediante estudios bioquímicos y moleculares, que hay dos clases de genes que contribuyen a la reacción de resistencia: los *genes de resistencia* (genes R), implicados en los procesos de reconocimiento y los *genes implicados en la respuesta de defensa* (genes DR). A diferencia de los genes R, los genes DR no muestran dominios conservados, sino que codifican para múltiples enzimas. Su estructura, expresión y función está siendo profundamente investigada (Li *et al.*, 1999). El descubrimiento de estos genes ha supuesto un espectacular avance para entender las bases moleculares de la resistencia a enfermedades en plantas y ha permitido el exitoso desarrollo de estrategias más sostenibles para el control de enfermedades (Wang *et al.*, 2007).

Actualmente, muchos esfuerzos se están centrando en la incorporación de resistencias duraderas y de amplio espectro a través de la introducción o manipulación de los genes DR. Con este propósito, se han clonado y caracterizado muchos de los genes implicados en la resistencia en numerosas especies de plantas, incluyendo más de 50 genes R y cerca de 100 genes DR, junto con sus marcadores de secuencias expresadas (ESTs). Con el desarrollo de las bases de datos genómicas y de las secuencias EST, se han podido identificar cada vez más genes de resistencia candidatos vía minado de datos. En el caso del maíz, podemos encontrar mucha información sobre sus secuencias y EST en las bases de datos Maize Genetics and Genomics (maizeGDB), GenBank o Maizesequence, entre otras (Wang *et al.*, 2007). Sin embargo, a pesar de que se ha llevado a cabo el mapeo de los principales genes de resistencia o de sus QTLs (*loci* de características cuantitativas) para casi todas las enfermedades del maíz (Wang *et al.*, 2007), hasta ahora sólo se han aislado y clonado dos genes de resistencia, el gen *Hm1*, que codifica una toxina reductasa, y el gen *Rp1-D* de resistencia a hongos (Wang *et al.*, 2007), lo que refleja la dificultad del estudio de la resistencia en plantas.

1.2.1. LOS GENES PR

Existen varios tipos de proteínas de defensa o proteínas PR (pathogenesis-related proteins) las cuales han sido clasificadas en 17 familias en base a sus características de secuencia, relaciones inmunológicas y actividad biológica (Tabla 1). Sin embargo, sólo 14 de ellas se han encontrado en plantas.

La mayoría de las proteínas PR son inducidas a través de la activación de compuestos de señalización de defensa tales como el SA, el JA o el etileno y, en muchos casos, su expresión parece mejorar la resistencia a dichos patógenos. Otras son inducidas durante la senescencia, heridas o estrés por frío (Muthukrisnan *et al.*, 2000; Van Loon *et al.*, 2006).

La conservación evolutiva de estas proteínas, tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, así como su divergencia en otras ocasiones, sugiere que desempeñan funciones esenciales en la vida vegetal, ya sean defensivas o de otro tipo (Van Loon *et al.*, 2006).

Tabla 1. Clasificación de las familias de proteínas PR y sus principales propiedades (Fuente: Van Loon *et al.*, 2006).

Familia	Tipo de miembro	Propiedades	Símbolo del gen
PR-1	PR-1a tabaco	Desconocida	<i>Ypr1</i>
PR-2	PR-2 tabaco	β -1,3-glucanasa	<i>Ypr2</i> , [<i>Gns2</i> (" <i>Glb</i> ")]
PR-3	P, Q tabaco	Quitinasa tipo I, II, IV, V, VI, VII	<i>Ypr3</i> , <i>Chia</i>
PR-4	"R" tabaco	Quitinasa tipo I, II	<i>Ypr4</i> , <i>Chid</i>
PR-5	S tabaco	Tipo Taumatina	<i>Ypr5</i>
PR-6	Inhibidor I tomate	Inhibidor-proteinasa	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (" <i>Pin</i> ")
PR-7	P69 tomate	Endoproteinasa	<i>Ypr7</i>
PR-8	Quitinasa pepino	Quitinasa tipo III	<i>Ypr8</i> , <i>Chib</i>
PR-9	"Peroxidasa formadora de lignina" tabaco	Peroxidasa	<i>Ypr7</i> , <i>Prx</i>
PR-10	"PR1" perejil	Tipo Ribonucleasa	<i>Ypr10</i>
PR-11	Quitinasa "clase V" tabaco	Quitinasa, tipo I	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>
PR-12	Rs-AFP3 rábano	Defensina	<i>Ypr12</i>
PR-13	THI2.1 <i>Arabidopsis</i>	Tionina	<i>Ypr13</i> , <i>Thi</i>
PR-14	LTP4 cebada	Proteína transportadora de lípidos	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>
PR-15	OxOA cebada (germen)	Oxalato oxidasa	<i>Ypr15</i>
PR-16	OxOLP cebada	Tipo oxalato oxidasa	<i>Ypr16</i>
PR-17	PRp27 tabaco	Desconocida	<i>Ypr17</i>

Entre las diversas PRs, PR-1 es el grupo dominante. La primera PR-1 se descubrió en 1970 y desde entonces, se han identificado en *Arabidopsis*, cebada, tabaco, arroz, pimiento, tomate, trigo y maíz (Liu y Xue, 2006). Se sabe que tras la infección con patógenos estas proteínas se inducen

de forma significativa y que limitan la actividad fúngica, lo que sugiere su papel en la defensa de la planta. Sin embargo, su función todavía no está clara (Liu y Xue, 2006).

Las proteínas de la familia PR-5 también se denominan proteínas tipo taumatina (Thaumatin-like proteins-TLPs), porque muestran similitudes estructurales y de secuencia con la proteína de sabor dulce de *Thaumatococcus daniellii*. La permatina, osmotina y zeamatina también se incluyen dentro de la familia de las TLPs. Se han aislado múltiples isoformas de la proteína PR-5 en varias especies de plantas, especialmente en cereales como el centeno, el arroz o la avena, observándose actividad antifúngica en ensayos de laboratorio. Los estudios realizados en plantas transgénicas de tabaco, arroz y patata con sobreexpresión de PR-5, han mostrado un incremento de la resistencia a *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora infestans*. Aunque todavía se desconoce el mecanismo de acción de estas proteínas, se cree que su actividad antifúngica podría estar asociada a mecanismos de formación de poros en las membranas de los hongos (Wang *et al.*, 2010).

1.2.2. LOS GENES HIR

Las proteínas inductoras de la respuesta hipersensible (HIR) son un grupo de proteínas implicadas en la muerte celular y la respuesta de defensa a enfermedades de las plantas. Se ha demostrado que la expresión de estos genes en las hojas de maíz y cebada juega un papel importante en el desarrollo espontáneo de lesiones de RH, en reacción al ataque de patógenos (Zhou *et al.*, 2010).

El análisis de su secuencia de aminoácidos indica la presencia del dominio de proteínas SPFH (Stomatins, Prohibitins, Flotillins, HflK/C) característico de las prohibitinas, estomatinas, así como otras proteínas de bacterias, plantas y animales que están asociadas con funciones de la membrana, por lo que se consideran miembros de la superfamilia PID (Proliferation, Ion and Death) (Figura 2). La superfamilia recibió este nombre debido a que las prohibitinas participan en la proliferación y control del ciclo celular, las estomatinas están implicadas en la regulación de los canales de iones y los genes *HIR* se asocian con reacciones de hipersensibilidad implicadas en la muerte celular y la resistencia frente a patógenos. Aunque estos genes están involucrados en diversos procesos fisiológicos, su similitud estructural sugiere que poseen una función bioquímica relacionada (Nadimpalli *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2010).

El hecho de que la función de los genes *HIR* esté conservada entre monocotiledóneas y plantas dicotiledóneas (Nadimpalli *et al.*, 2000), así como su presencia ubicua, sugiere que pueden ser de vital importancia y no tener funciones redundantes (Rostocks *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2008).

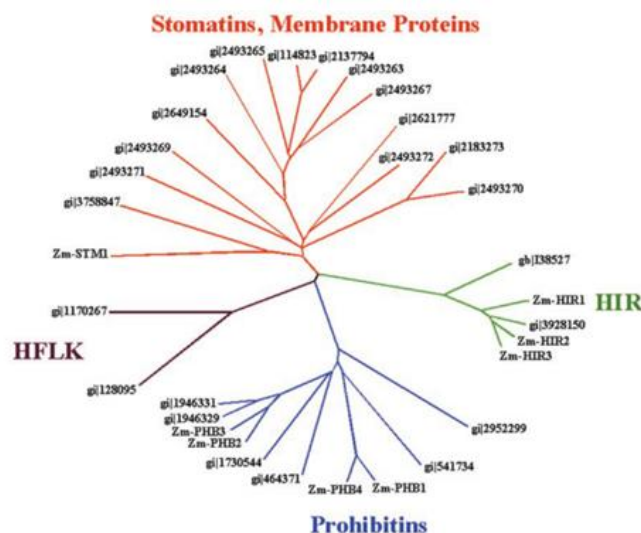


Figura 2. Dendrograma que muestra las relaciones entre 32 miembros de la superfamilia PID y su división en 4 superfamilias: estomatinas (color rojo), prohibitinas (color azul), proteínas vegetales HIR (color verde), proteínas de membrana bacterianas HFLC y HFLK (color marrón) (Fuente: Nadimpalli *et al.*, 2000).

La primera evidencia de la implicación de los genes *HIR* en la RH se observó en el tabaco. El gen *NG1* fue capaz de provocar la formación de lesiones similares a las producidas durante la RH e indujo de forma específica a la proteína relacionada con la patogénesis PR-2 (β -glucanasa ácida). Desde entonces, se han clonado numerosos genes inductores de la RH, o genes *HIR* (hypersensitive-induced response), tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas, demostrándose su implicación en la RH y defensa de la planta (Zhang *et al.*, 2009).

En el maíz se han aislado 3 homólogos a *NG1*, *Zm-hir1*, *Zm-hir2* y *Zm-hir3* (Nadimpalli *et al.*, 2000). Los estudios realizados sobre la regulación de estos genes, indicaron que la proteína HIR3 se sobreexpresaba en las hojas de mutantes Les9 en estado de prelesión y que esta expresión se reducía cuando se cruzaba en un fondo genético Mo20W (supresor del fenotipo mutante). Posteriormente, fueron identificados 4 genes *HIR* en la cebada (*Hv-hir1*, *Hv-hir2*, *Hv-hir3* y *Hv-hir4*) (Rostocks *et al.*, 2003) observándose de nuevo la sobreexpresión de HIR3 en mutantes LMM tipo FN (*fast-neutron*), mientras que la expresión de HIR1 y HIR2 apenas se veía afectada o, en algún caso, era ligeramente reprimida. Recientemente, se han identificado los genes *Ta-hir1* (Yu *et al.*, 2008), *Ta-hir3* (Zhang *et al.*, 2009) y *Ta-hir2* (Zhang *et al.*, 2011) en hojas de trigo infectadas por el hongo de la roya. También se han identificado genes *HIR* en el arroz y el pimiento asociados a las proteínas LRR (Leucine-Rich Repeat proteins) (Jung y Hwang, 2007; Zhou *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2011). En ambos casos se usaron plantas transformadas de *Arabidopsis* y tabaco para estudiar cómo afectaba la expresión constitutiva del gen en la resistencia a enfermedades.

A pesar de los mencionados estudios, es necesaria la identificación de más genes asociados con la RH para comprender mejor los mecanismos moleculares implicados y el papel específico de los genes *HIR* en la defensa de la planta (Zhang *et al.*, 2011).

1.3. LOS MUTANTES LESIONADOS

Los LMM son una clase de mutantes que manifiestan a menudo síntomas similares a los producidos durante una enfermedad, sin un agente causal presente. Aunque inicialmente se identificaron en mutantes de maíz, se han encontrado en todas las especies de plantas examinadas (Dietrich *et al.*, 1994).

El fenotipo LMM se caracteriza por la aparición de manchas necróticas en distintas partes de la planta y, con frecuencia, se hereda como una mutación simple que puede ser dominante, parcialmente dominante o recesiva. Curiosamente, la mayoría de los LMM poseen mutaciones dominantes con ganancia de función. Los fenotipos asociados con estos mutantes dan a entender que pueden estar afectados en las rutas de respuesta desencadenadas por la infección con patógenos (Dietrich *et al.*, 1994). Además, los mutantes lesionados de monocotiledóneas también expresan genes relacionados con la defensa e incrementan los niveles de SA después del desarrollo de las lesiones, de forma similar a lo que ocurre en plantas de maíz infectadas por patógenos (Morris *et al.*, 1998).

Los LMM se pueden separar en dos clases: los iniciadores de lesión, en los que se forman numerosas lesiones inicialmente, pero manteniendo un tamaño moderado; y los LMM de propagación, en los que inicialmente aparecen pocas lesiones, pero una vez formadas, se extienden de forma continua llegando a cubrir todo el tejido (Penning *et al.*, 2004).

Los genes de una serie de LMM han sido clonados recientemente, dejando al descubierto su participación en múltiples vías. Por ejemplo, algunas lesiones LMM son el resultado de aberraciones estructurales en los genes R y que dan lugar a su activación durante las interacciones planta-patógeno. Otras lesiones, son resultado de la alteración de la homeostasis celular o de alteraciones en genes con funciones clave en una o varias vías que conducen a la muerte celular programada (PCD). Aunque los LMM son originados por mutaciones en genes individuales, su fenotipo se ve influido por una serie de factores tanto externos (Tª, humedad relativa, luz, etc.) como internos (edad de la planta y el fondo genético); sin embargo, lo que dicta el comportamiento de la lesión LMM sigue siendo desconocido. El fondo genético puede influir intensamente en la gravedad de las lesiones. Se han encontrado líneas puras de maíz que

suprimen o mejoran el fenotipo de múltiples LMM dependiendo de los parentales empleados (Penning *et al.*, 2004).

En el maíz se conocen numerosos mutantes lesionados, algunos de los cuales se originaron por mutaciones en genes de resistencia conocidos, como es el caso de las recombinaciones en el *locus* del maíz Rp1 que dan lugar en determinadas ocasiones a LMM resistentes a todos los hongos aislados.

Todavía no está claro si la resistencia a enfermedades es debida a la expresión constitutiva de la SAR, o si tiene otras bases (Morris *et al.*, 1998). Los exhaustivos estudios de los mutantes lesionados, permiten conocer de forma más precisa las rutas de la PDC y resistencia en plantas. Sin embargo, los fenotipos de algunos LMM no están relacionados directamente con la respuesta de defensa, y pueden ser el resultado de disrupciones de la fisiología celular (Yao *et al.*, 2009).

1.4. ANÁLISIS GENOTÍPICO MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES

El desarrollo de técnicas moleculares para el análisis genético ha permitido un sensacional incremento de nuestro conocimiento sobre la genética de los cereales y un mejor entendimiento de sus genomas (Korzun, 2003). Concretamente, el uso de marcadores moleculares permite evaluar la variabilidad genética a nivel del ADN, siendo muy útiles en los programas de selección y mejora genética.

Los marcadores moleculares son biomoléculas de secuencia conocida que se pueden relacionar con un rasgo genético. Además, pueden ser detectados por diversos métodos y su herencia puede ser monitoreada, lo que ayuda a eliminar los inconvenientes de una selección basada en el análisis exclusivo del fenotipo (Sharma *et al.*, 2008).

La aplicación de estos marcadores en la investigación genética y mejora de los cereales es muy diversa. Los principales usos incluyen la identificación y *fingerprinting* de genotipos, establecimiento de las relaciones de parentesco o pedigree, mapeo de genomas y genes, mejora genética, selección asistida por marcadores, distribución de la variabilidad genética en poblaciones, taxonomía, diagnóstico de enfermedades, etc. (Sharma *et al.*, 2008).

En los últimos años, se han desarrollado diferentes sistemas de marcadores moleculares basados en ADN, tales como los RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms), RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs), STS (Sequence Tagged Sites), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms), SSRs (Simple Sequence Repeats) o microsatélites, SNPs

(Single Nucleotide Polymorphisms), etc. Cada tipo de marcador posee unas características que lo hacen adecuado para su empleo para diversos propósitos como la selección asistida por marcadores o la genómica comparada, entre otros (Prasanna y Hoisington, 2003). De entre los diferentes tipos de marcadores disponibles, los preferidos para su uso en la mejora genética del maíz son los microsatélites, debido a su facilidad de análisis, alto nivel de polimorfismo y herencia codominante (Prasanna y Hoisington, 2003; Hayden *et al.*, 2008).

Los marcadores microsatélite se encuentran ampliamente distribuidos por todo el genoma. Consisten en pequeñas secuencias nucleotídicas específicas (2-6 pb) que se repiten en tándem (6 a 100 veces). Existen varios tipos de marcadores con secuencias microsatélite, aunque los principales se denominan SSR (simple sequence repeats). A pesar de su amplia distribución en el genoma, no están uniformemente espaciados, estando poco representados en las regiones subteloméricas. Son más frecuentes en las regiones no codificantes y poseen una gran variabilidad y facilidad de análisis. En plantas, los SSRs de di y trinucleótidos son los más abundantes. Se estima una frecuencia de 1 microsatélite cada 50 kb, siendo las más frecuentes AC/TG y TAT (Salleres, 2010).

Las secuencias adyacentes a los SSR se han conservado a lo largo la evolución, lo que permite su amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cuando se usan primers marcados con fluorescencia, los productos de la amplificación pueden separarse mediante electroforesis capilar en geles de acrilamida y ser detectados en un secuenciador automático, permitiendo distinguir alelos que difieren en unos pocos pares de bases (Salleres, 2010). Este es uno de los métodos más rápidos y precisos para el genotipado de SSRs (Hayden *et al.*, 2008).

1.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE qRT-PCR

La transcripción reversa combinada con la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, es un método poderoso para la cuantificación de la expresión génica (Livak *et al.*, 2001).

A pesar de que existen arrays de ADN y de oligonucleótidos, que contienen la mayoría de los genes predichos para un gran número de especies, todavía es difícil la detección y cuantificación de la expresión génica mediante esta tecnología debido a limitaciones en la sensibilidad y fiabilidad, especialmente para transcritos de baja abundancia. Se estima que la qRT-PCR es 100 veces más sensible que los arrays de ADN en la detección de transcritos (Czechowski *et al.*, 2004; Caldana *et al.*, 2007).

La generación de productos de PCR puede detectarse por la medición de la señal de fluorescencia emitida por el SYBR Green al intercalarse entre las hebras de ADNds. En solución, cuando no está unido, exhibe muy poca fluorescencia; sin embargo, ésta incrementa enormemente ($\lambda=530\text{nm}$) cuando se une al ADNds y este incremento de la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de doble hebra generada (<http://www.appliedbiosystems.com>).

La qPCR se descompone en cuatro fases: la línea base, la fase exponencial temprana, la fase exponencial y la fase *plateau*. En la fase exponencial temprana, la cantidad de fluorescencia es significativamente mayor que los niveles de fondo. El número de ciclo en el cual la señal de fluorescencia supera el valor umbral de la fluorescencia de fondo y es detectada por primera vez, se conoce como ciclo umbral C_T (Threshold cycle). Este valor es representativo del número de copias molde inicial y se usa para el cálculo de los resultados experimentales (Wong y Medrano, 2005).

Los dos métodos más utilizados para el análisis de datos de qPCR son la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa. La cuantificación absoluta usa una serie de diluciones de concentración conocida para generar una curva estándar, a partir de la cual, por extrapolación de los valores C_T en la ecuación de la recta obtenida, se puede determinar el número de copias inicial del transcrito de interés. Este método asume que los estándares y las muestras tienen eficiencias de amplificación iguales, empleando para el cálculo de la eficiencia los datos de la curva estándar (Wong y Medrano, 2005).

La cuantificación relativa describe los cambios en la expresión de los genes de interés en relación a un gen control o *house-keeping*, o a una muestra de referencia en la condición considerada como cero en el estudio que se lleve a cabo (Livak *et al.*, 2001). Los *house-keeping* son genes de expresión constitutiva, la cual no varía en las condiciones del experimento, y que se usan para la normalización de los datos de expresión. Se han desarrollado varios modelos matemáticos para el cálculo de la expresión génica relativa. Uno de ellos, es el modelo de Pfaffl (2001), en el que la tasa de expresión relativa del gen de interés se calcula en base a la eficiencia y variación de las C_T del gen de interés con un control, y se comparan en base a un gen de referencia:

$$\Delta C_T \text{ gen} = C_T \text{ gen interés} - C_T \text{ gen referencia}$$

$$\Delta C_T \text{ control} = C_T \text{ control} - C_T \text{ gen referencia}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ gen} - \Delta C_T \text{ control}$$

Los datos de cuantificación, tanto absoluta como relativa, se representan en unidades de *Fold Change* (FC) según la ecuación $2^{-\Delta C_T}$ o $2^{-\Delta\Delta C_T}$, respectivamente.

2. OBJETIVOS

- Establecer las diferencias en la expresión de 5 genes relacionados con la hipersensibilidad (*Zm-hir1*, *Zm-hir2* y *Zm-hir3*) y patogenicidad (*PR-1* y *PR-5*), entre dos líneas del CIAM, el mutante L8 y el fenotipo silvestre L11, y 8 líneas mutantes conocidas y caracterizadas procedentes de la Universidad de Illinois (USA), mediante qRT-PCR.
- Caracterizar los microsatélites (SSRs) asociados a cada mutación para los genes de hipersensibilidad (*Zm-hir1*, *Zm-hir2* y *Zm-hir3*) y de patogenicidad (*PR-1* y *PR-5*) mediante PCR y análisis de fragmentos en secuenciador.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Para este estudio se utilizaron ocho líneas mutantes de maíz (*Lesion Mimic Mutant-LMM*) procedentes del *Maize Genetics Cooperation Stock Center* (MGCSC, Universidad de Illinois-USA) y dos líneas isogénicas procedentes del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM): una mutante LMM y otra de fenotipo silvestre (Tabla 2, Figura 3).

Tabla 2. Descripción de las líneas de mutantes LMM de maíz utilizadas en el estudio.

LMM	Origen	Descripción
121DA (Ils1-N501B)	MGCSC	Mutación recesiva (<i>lethal leaf spot1</i>). Presentan lesiones clorótico-necróticas similares a las producidas durante la infección con <i>Helminthosporium carbonum</i> . Estas lesiones son de tamaño medio, elípticas y a menudo dispuestas en anillos concéntricos alrededor del tejido muerto y seco. Las lesiones comienzan como pequeñas manchas cloróticas en el estadio de 2-4 hojas, posteriormente se agrandan y se fusionan para producir la senescencia prematura de las hojas y, a menudo, la muerte de la planta. Son mutantes no reproductivos.
125A (Les2-N845A)	MGCSC	Mutación dominante. Aparición de pequeñas lesiones blancas parecidas a las lesiones formadas por las infecciones por hongos en las líneas de resistencia. Comienzan a formarse en el estadio de 2-3 hojas. La importancia de las lesiones depende de la Tª y el fondo genético.

Tabla 2. Continuación.

LMM	Origen	Descripción
X28E (Les3-NA781)	MGCSC	Mutación dominante. Presentan lesiones grandes (1,0 a 1,5 cm de diámetro), elípticas y necróticas que pueden variar de color paja a un centro de color marrón rodeada de anillos concéntricos de tejido muerto. Las lesiones aparecen primero en las hojas más bajas y sucesivamente en las hojas más jóvenes hasta su maduración. En los heterocigotos (Les3 / +), aparecen pocas lesiones pero en los homocigotos se desarrollan en gran número, dando la impresión de que las hojas están arrugadas debido a la distorsión causada por la formación de las lesiones. Las lesiones se expresan por primera vez a las 6 semanas después de la siembra.
227E (Les4-N1375)	MGCSC	Mutación dominante. Muestran lesiones necróticas que aparecen a los 40-57 días tras la siembra (cerca de la floración) en la lámina de la hoja y la vaina. Desarrollan dos tipos de lesiones: 1) pequeñas lesiones redondas y blancas; 2) lesiones de tamaño medio, de forma irregular y color marrón, ambas aparecen en grupos intercalados esparcidas al azar. La rápida proliferación y coalescencia de las lesiones lleva a la senescencia inicial de la planta. La viabilidad es normal hasta la floración. En homocigotos, las lesiones son agresivas.
X27D (Les 6-N1451)	MGCSC	Mutación dominante. Presentan manchas cloróticas de tamaño pequeño a mediano y con forma irregular que dan a toda la hoja un tono amarillento moteado. También desarrollan otras lesiones necróticas blancas, menos dispersas y de tamaño mediano. Se expresa en el limbo de la hoja y la vaina. La expresión de las lesiones tiene lugar en el estado de siete hojas.
217I (Les10-NA607)	MGCSC	Mutación dominante. Muestran manchas de tamaño pequeño, redondas y cloróticas y lesiones medianas, redondas y necróticas distribuidas uniformemente en el limbo de la hoja y la vaina. El fenotipo mutante se expresa a los 20 días. No son viables reproductivamente.
217J (Les11-N1438)	MGCSC	Mutación dominante. Presentan lesiones de gran tamaño que varían según las condiciones ambientales y el fondo genético. Tienden a aparecer en cadena a lo largo de las venas de las hojas. El fenotipo se puede expresar en estadio de 1 o 2 hojas.
608D (Les13-N2003)	MGCSC	Mutación dominante. Se caracterizan por el desarrollo de frecuentes manchas necróticas pequeñas y medianas en la hoja, el tallo y la vaina, que aparecen en el estadio de 5 hojas. En ocasiones se unen para formar largas tiras necróticas a lo largo de las venas de la hoja. La difusión provoca la senescencia de la hoja entera. Las plantas mutantes son entre 1/3 y 2/3 de la altura de la planta normal.
L8 (EC309AH)	CIAM	Cruce de una variedad sintética, obtenida con líneas de origen gallego desarrolladas en el CIAM, y una línea americana. El fenotipo del mutante se caracteriza por presentar lesiones tipo Les 3 que aparecen en estadio de 4-6 hojas. El desarrollo de lesiones depende de las condiciones ambientales.
L11 (EC309HNI)	CIAM	Línea isogénica de la L8, pero con fenotipo silvestre.

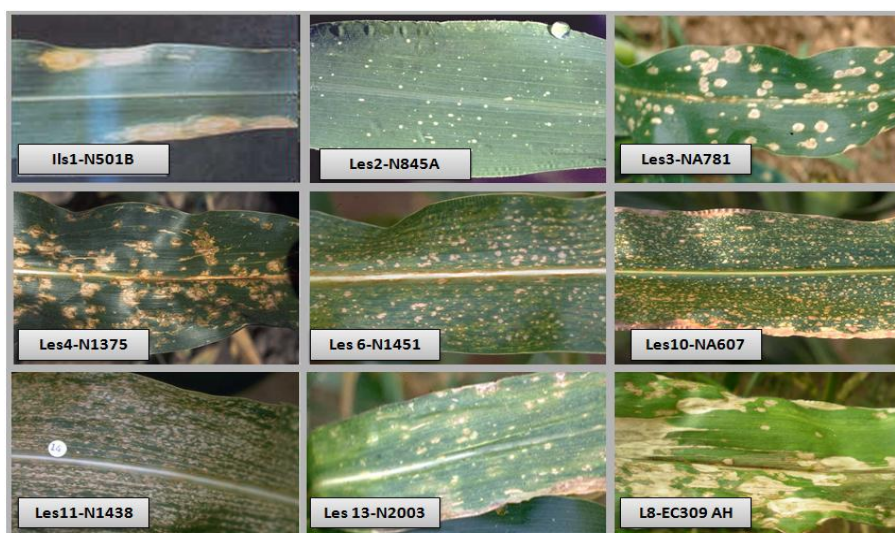


Figura 3. Fenotipos de los mutantes lesionados.

Las diferentes líneas de maíz fueron cultivadas en invernadero. En estadio de 3-4 hojas, se recolectaron las hojas de 5 plantas de cada mutante, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

3.2. ESTUDIO CON MARCADORES MOLECULARES

3.2.1. SELECCIÓN DE LOS MARCADORES MICROSATÉLITE

La selección de los marcadores SSR asociados a cada gen (Tabla 3) se realizó en base a sus posiciones cromosómicas. La localización de las posiciones cromosómicas de los genes de interés se determinó a partir de la bibliografía (Ahn y Tanksley, 1993; Collins *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999; Ramalingam *et al.*, 2002; Rostocks *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007) y de las bases de datos disponibles (maizesequence.org y MaizeGDB). Se eligieron en la colección de SSRs del CIAM aquellos que mapeaban en el *bin* o *bins* próximos a cada *loci*.

Tabla 3. Posibles posiciones cromosómicas de los genes del proyecto y SSRs asociados (colección del CIAM).

	Cromosoma	Bin	SSR CIAM
Zm-hir 1	4	4,05	umc1175/ umc1346/ umc1303
Zm-hir 2	2	2,6	umc1156/ umc1065/ umc1755/ umc2192/ umc1755
	7	7,3	umc1718/ umc1134/ umc1324
	6	6,01	umc2074/ umc1517/ umc1444
Zm-hir 3	6	6,07/6,08	umc1779/ umc1621/ umc2059/ umc2324
	4	4,03	umc1821/ umc2176/ umc2039/ umc2281/ umc1902
PR-1	7	7	umc1545/ umc1788/ umc1241
	8	8,03/8,09/8,08	umc1457/ umc1778/ umc1069/ umc1933
PR-5	1	1,06	umc1590/ umc1122
	1	1,11	umc1118/ umc1111/ umc1744
	3	3,6	umc2169/ umc1311
	5	5,02	umc1769/ umc2115
	5	5,03	umc1315/ umc1110

3.2.2. EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN se basó en el protocolo modificado de Doyle y Doyle (1987).

Se trituraron en un mortero 0,3-0,6 g de tejido vegetal congelado a -80°C con 1200 μl de Buffer CTAB (2% CTAB, 1,42M NaCl_2 , 100 mM Tris pH 8,0, 20 mM EDTA pH 8,0, 2% PVP-40, 4 mM sodiodietiltiocarbamato, H_2O_d y 5 mM ácido ascórbico) a 65°C . La mezcla se pasó a tubos de centrífuga, se taparon y homogeneizaron en vórtex. Seguidamente, se incubaron a 60° - 65°C

60-90 min. Tras la incubación, se añadieron 1200 µl de Fenol:cloroformo:isoamyl alcohol (25:24:1), se agitó por inversión 5-10 min y las muestras fueron centrifugadas 15 min a 4500 rpm. El sobrenadante se lavó por segunda vez con 1000 µl de cloroformo:isoamyl alcohol (24:1) y se centrifugó de nuevo. A continuación, se transfirió la fase acuosa a un nuevo eppendorf y se procedió a la precipitación del ADN por adición de 450 µl de isopropanol (2-propanol) a -20°C y 45 µl de 3 M NaAcetato pH 5.2 a 2°C. Tras invertir varias veces los tubos, se dejaron a -20°C toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 13000 rpm 10 min, para eliminar el isopropanol y el NaAc. El pellet, se resuspendió con 500 µl de 70% EtOH, se centrifugó y se decantó, dejándolo secar 1 h a T^a ambiente. Extraídos los ácidos nucleicos, se hizo un tratamiento con RNasa. Para ello, se resuspendió el pellet en 100 µl de Buffer 1X TE (Tris-EDTA pH 8,0), se añadió 4 µl de RNasa (10 mg/ml) y se incubó 30 min a 37°C. Seguidamente, el ADN libre de ARN se precipitó añadiendo 50 µl de 7,5 M acetato amónico, e incubándolo a -20°C 30 min. Tras la precipitación en frío, se centrifugó a 13000 rpm 10 min, se lavó con 500 µl de 70% EtOH y se dejó secar el pellet 45 min. Finalmente, el ADN se resuspendió en 50 µl de agua Milli-Q y se guardó en la nevera hasta la cuantificación y determinación de la calidad en NanoDrop 2000 (ThermoScientific).

Una vez conocida la concentración de las muestras de ADN, se diluyeron en agua Milli-Q autoclavada para ajustarlas a una concentración de trabajo de 50 µg/ml, adecuada para la amplificación.

3.2.3. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS SSR MEDIANTE PCR

Para el análisis se hizo un “bulk” de ADN de los individuos recolectados para cada una de las líneas mutantes. Cada “bulk” se analizó con un total de 41 marcadores SSR, pertenecientes a la colección de SSR desarrollada en el CIAM (Anexo 1).

La amplificación de los SSRs se realizó individualmente en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), en las condiciones que se especifican en la tabla 4. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl en microplacas de PCR conteniendo: 5 µl de *FastStart PCR Master 2x* (ROCHE), que contiene una mezcla de FastStart Taq DNA Polymerase, cloruro de magnesio (MgCl₂), buffer de reacción 2x y nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP 0,4 mM); 1 µL de primer forward, 1 µl de primer reverse, 2 µl de agua Milli-Q autoclavada y 1 µl de ADN. Tras la amplificación se conservaron las placas de PCR a -20°C para posteriores análisis.

Tabla 4. Condiciones de la amplificación por PCR.

Pasos	Temperatura	Tiempo (min)	Ciclos
Activación de la Taq polimerasa	95 °C	2	1
Desnaturalización	95°C	1	10
Annealing	Primers marcaje ABI: gradiente descendiente de 1°C por ciclo desde 67°C a 57°C Primers marcaje Beckman: gradiente descendiente de 1°C por ciclo desde 72°C a 65°C	1	
Extensión	72°C	1	
Desnaturalización	95 °C	1	30
Annealing	57°C	1	
Extensión	72°C	1	
Extensión final	72°C	10	1
Mantenimiento	4°C	Indefinido	1

3.2.3.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los productos de amplificación se migraron en geles de agarosa al 1% en TAE 1x (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA a pH 8,0), para comprobar la correcta amplificación, es decir, que no se forman dímeros y que no se ha degradado el ADN (no se observa *smear*). En el gel se cargaron 4 µl del producto de PCR con 2 µl de buffer de carga. Tras la electroforesis (20 min a 120 mV), los geles se tiñeron en oscuridad con una solución de bromuro de etidio al 10% durante 15 min y se visualizaron en transiluminador UV.

3.2.4. ANÁLISIS DE LOS FRAGMENTOS EN SECUENCIADOR AUTOMÁTICO

La separación y detección de los fragmentos SSRs amplificados se llevó a cabo mediante electroforesis capilar. El primer forward para cada SSR está marcado con un fluoróforo (6FAM o D4-azul-; VIC o D3 -verde-; NED o D3 -negro-; PET o D1 -rojo-) y genera fragmentos dentro de un rango de tamaños conocido (pequeño: 60-100 pb; mediano: 100-140 pb; grande: 140-200 pb), lo que permite su identificación tras la electroforesis y la posibilidad de inyectar más de un SSR en cada migración sin que se produzcan interferencias entre ellos. La separación electroforética se realizó en dos secuenciadores automáticos diferentes según el fluoróforo utilizado en el marcaje del primer: el equipo ABIPrism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) (Figura 4) para los fluoróforos 6FAM, VIC, NED y PET, y el equipo GeXP (Beckman Coulter, USA) (Figura 5) para los fluoróforos D1, D2, D3 y D4.

Para el análisis en el sistema ABI310, se prepararon tubos de reacción conteniendo 12 μl de una mezcla de formamida (Hi-Di™ formamide, Applied Biosystems) y un estándar interno de tamaños de fragmentos comprendidos entre los 35 a 500 pb (500 LIZ Size Standard, Applied Biosystems) en proporción 25:1 y 1 μl de producto de PCR, previamente desnaturizado a 95°C durante 5 min. En cada carrera se establece un potencial de migración desde el cátodo al ánodo de 15000 V situados en los extremos del capilar. La muestra se inyecta durante 5 s, siendo el potencial eléctrico lo que hace que una parte de la muestra entre en el capilar. Posteriormente, los extremos del capilar se sumergen en una solución tampón y tiene lugar la electroforesis durante un tiempo establecido de 25 min a una Tª de 60 °C, suficientes para que la muestra pase por el detector. Cuando los fragmentos de ADN alcanzan la ventana del detector (zona del capilar sin recubrimiento), un láser excita el fluoróforo y la señal emitida es recogida por una cámara CCD (*Charge-Coupled Device*). Los datos obtenidos son analizados mediante el software GeneScan v.3.7., el cual permite cuantificar los fragmentos de ADN y determinar su tamaño por comparación con los fragmentos del estándar interno de tamaños que se inyectó junto con la muestra.

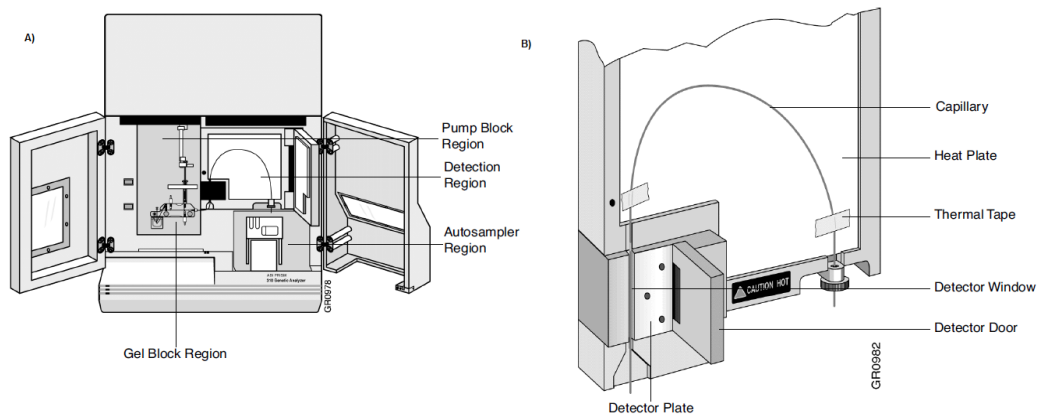


Figura 4. Esquema de un secuenciador automático ABI Prism 310 Genetic Analyzer. A) Diagrama del instrumento con las puertas abiertas. B) Diagrama de la región de detección (Fuente: <http://www.appliedbiosystems.com>).

Para el análisis en el sistema GeXP, se prepararon las muestras añadiendo a 39 μl de una mezcla de SLS (sample loading solution con formamida, Beckman Coulter) y un estándar de tamaño de fragmentos (400 pb size standard kit, Beckman Coulter), y 0.5 μl de producto PCR. En este caso la desnaturización previa a la migración se realiza en el propio equipo. La migración se realizó a 50°C durante 37 min. El funcionamiento del equipo GeXP es similar al del ABI310, pero a diferencia de este último, posee 8 capilares en paralelo, analizando mayor número de muestras en menor tiempo.



Figura 5. Fotografía de un secuenciador automático GeXP. Imagen de la izquierda: vista frontal externa del equipo. Imagen superior derecha: estructura protectora de los capilares encargada del control de la temperatura, las flechas indican donde se sitúan las zonas de inyección y detección del sistema de capilares. Imagen inferior derecha: array de 8 capilares, compuesto por tres zonas – inyección/migración/detección.

3.3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE GENES DE RESPUESTA A ENFERMEDADES

3.3.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ARN

Las hojas de maíz recolectadas, conservadas a -80°C , se trituraron en morteros congelados con nitrógeno líquido sobre bandejas de hielo. El ARN es extremadamente sensible a la T° , por ello es de gran importancia que todo el proceso se realice en frío.

Se ensayó la extracción utilizando un kit comercial High Pure RNA Tissue de ROCHE (según las especificaciones del kit) y mediante extracción con fenol-cloroformo. El rendimiento en ARN fue mayor con el método del fenol-cloroformo, así que fue el utilizado finalmente en este estudio.

3.3.1.1. EXTRACCIÓN CON FENOL-CLOROFORMO

La extracción de ARN se basó en el protocolo modificado de Lagrimini *et al.* (1987).

Se extrajeron un total de 5 muestras de ARN por cada línea mutante. Se homogeneizaron en vórtex 200 mg de hoja pulverizada con una mezcla de 550 μl de Tampón de Extracción (8M CILi; 0,2 M Tris pH 8,0; 25 mM EDTA; 20% SDS; H_2O_d autoclavada) y 550 μl de fenol. A continuación, se centrifugaron 6 min a 6500 rpm a T° ambiente. El sobrenadante se transfirió cuidadosamente a tubos eppendorf con 550 μl de fenol y 550 μl de cloroformo, se homogeneizó en vórtex y se centrifugaron de nuevo las muestras. Se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos y se añadió 1/3 del volumen de LiCl, mezclando por inversión. Se dejó precipitar toda la noche

en congelador a -20 °C para evitar la degradación del ARN. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm, 30 min a 4 °C. El precipitado resultante se resuspendió en 300 µl de H₂O_d, 30 µl de 3 M AcNa y 600 µl de EtOH absoluto, se agitó por inversión y se dejó en congelador a -20 °C durante 1-2 h. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 13000 rpm, 20 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a T^a ambiente 15-20 min. El ARN precipitado se resuspendió en 25 µl de agua Milli-Q autoclavada, se cuantificó en NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y se almacenó a -80 °C.

3.3.1.2. PURIFICACIÓN

La purificación del ARN se realizó con un kit comercial NucleoSpin[®] RNA Clean-up (Macherey-Nagel), según las especificaciones del kit, se cuantificó en NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y se almacenó a -80 °C.

3.3.2. DISEÑO DE PRIMERS

El diseño de los primers es un paso crítico ya que determina la longitud del amplicón, la T^a de *melting*, la eficiencia y rendimiento de la amplificación y el programa de PCR que se debe usar.

Para el diseño de los primers, se realizó una búsqueda bibliográfica previa de las secuencias y primers de los genes a estudiar que han sido utilizados en otros trabajos de investigación (Morris *et al.*, 1998; Nadimpalli *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2008; Chintamanani *et al.*, 2010). Además de la bibliografía, se empleó el programa on-line PRIMER 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) para el diseño específico de los primers de los genes de interés *Zm-hir1*, *Zm-hir2*, *Zm-hir3*, *Zm-PR1* y *Zm-PR5* (Tabla 5). Para ello, se cargaron las secuencias de dichos genes por separado en formato FASTA y se especificó en el programa que cumplieren las siguientes características: tamaño del primer entre 19-21 pb (óptimo 20 pb); tamaño del fragmento amplificado entre 50- 120 pb (óptimo 90 pb); T^a de melting entre 57-63 °C (óptimo 60°C); % CG entre 40-60 (óptimo 50); no horquillas ni dímeros.

Tabla 5. Características de los primers seleccionados.

Gen	Accession number NCBI	Secuencia del primer Forward	Secuencia del primer Reverse
<i>Zm-hir1</i>	AF236373	5'-GATCAAGAGAGCCGAAGGTG-3'	5'-TGAGCCCATCCACTATAGCC-3'
<i>Zm-hir2</i>	AF236374	5'-CAACACCAGGGAACAAATCC-3'	5'-TTCTGCTCAAATGCATCGTC-3'
<i>Zm-hir3</i>	AF236375	5'-AGGTGCCAAGTGCAGATACC-3'	5'-TAAACCTGCCCTGGTTGAAG-3'
<i>PR-1</i>	U82200	5'-TACGGCGAGAACCTCTTCTG-3'	5'-TGTTGGTGTGCTGGTCTAG-3'
<i>PR-5</i>	U82201.1	5'-ACATGAAGACCATGCCTGT-3'	5'-ATGCATGCAGAGCCTATTCC-3'
<i>GADPH</i>	AA1337	5'-TGCACCTTTGTTCCCTTCC-3'	5'-TCACCACAAGCAGCAAAAAG-3'

Tras el diseño, se encargó su síntesis química a la casa comercial SIGMA-ALDRICH. Una vez sintetizados los primers, se reconstituyeron a una concentración de 100 μM con agua destilada autoclavada y se prepararon mixes 2 μM con los primers forward y reverse, que se almacenaron a -20°C hasta su utilización en la qPCR.

3.3.3. SÍNTESIS DE ADNc MEDIANTE RT-PCR

Para la síntesis de ADNc se usó el kit comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (ROCHE). Todo el proceso se realizó en hielo, evitando romper la cadena de frío.

Se prepararon en tubos de PCR estériles libres de nucleasas, 7 μl con 1 μg de ARN y H_2O_d . Se añadieron 1 μl de oligo dT₁₈ y 5 μl de H_2O calidad PCR, hasta un volumen final de 13 μl , y se incubaron 10 min a 65°C en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Posteriormente, se añadió a cada reacción 7 μl de un mix compuesto por: 4 μl de *5x Transcriptor Reverse Buffer*, 0,5 μl de *Protector de RNasa Inhibitor 400*, 2 μl de *Deoxynucleotide* 10 mM y 0,5 μl de *Transcriptor reverse* 20 U/ml, para obtener un volumen final de 20 μL . Las muestras fueron incubadas en las condiciones que se especifican a continuación:

- 1^{er} ciclo de 30 min a 55°C (síntesis de ADNc)
- 2^o ciclo de 5 min a 85°C (eliminación y desactivación de las enzimas)
- 3^{er} ciclo de tiempo indefinido a 4°C (conservación ADNc)

Una vez sintetizado el ADNc, se añadieron 30 μl de agua libre de RNasas, para llevar las muestras a un volumen final de 50 μl . Tras homogeneizarlas bien, se determinó su concentración y calidad en NanoDrop 2000 (ThermoScientific). Finalmente se conservaron a -20°C hasta su utilización en la qPCR.

3.3.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE qPCR

El ADNc obtenido mediante RT-PCR se utilizó directamente como molde en el análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μl , en microplacas de qPCR conteniendo cada reacción: 10 μl de SYBR Green, 6 μl del mix de primers 2 mM, 2 μl de H_2O_d y 2 μl de ADNc. La qPCR se realizó en un termociclador i-Cycler iQTM5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD) en las condiciones especificadas en la tabla 6. Se hicieron tres réplicas de cada experimento. El gliceraldehido-3-

fosfato-deshidrogenasa (*GADPH*) se empleó como gen de referencia (*house keeping*) y la expresión de los genes de la línea silvestre L11 se usaron como control interno. Los datos de expresión se calcularon como unidades de *Fold Change* normalizadas con el gen de referencia y comparadas con el fenotipo silvestre (expresión relativa; Pfaffl, 2001). En el caso del gen PR-5, se calculó la expresión génica absoluta (Bustin, 2000), en la cual se comparan directamente los Cts del gen problema con el ΔC_t del gen de referencia, por mostrar eficiencias de amplificación comparables.

Tabla 6. Condiciones de PCR en Tiempo Real.

Procedimiento	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación de la Taq polimerasa	95 °C	10 min	1
Desnaturalización	95 °C	15 s	50
Annealing	64 °C	1 min	
Estado de disociación	Incrementos de 1°C por ciclo desde 64-95 °C	10 min	63

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la consecución de los objetivos propuestos en este trabajo, se realizó un análisis estadístico sencillo, basado en las diferencias entre medias, con el paquete estadístico SPSS v.15.0 (2006). En primer lugar, se realizó una prueba de normalidad, mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y el test de Shapiro-Wilk, con los datos de los diferentes marcadores. En base a los resultados obtenidos del anterior contraste, se compararon las medias de cada uno de los marcadores SSR respecto al fenotipo normal, mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney y las medias de cada uno de los marcadores de expresión entre líneas mediante el test paramétrico t de Student.

3.4.1. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

Existe una gran diversidad de métodos estadísticos para cuantificar la diversidad genética, los estadísticos más empleados son: el porcentaje de *loci* polimórficos, el número de alelos por *locus*, la heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) y el contenido de información polimórfica (PIC)

En este trabajo, se calculó el PIC para cada uno de los marcadores SSR según el método descrito por Botstein *et al.* (1980):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 f_i^2 f_j^2$$

donde n es el número de alelos; f_i y f_j son las frecuencias de los $i^{\text{ésimo}}$ y $j^{\text{ésimo}}$ alelos, respectivamente.

El valor PIC proporciona una estimación del poder discriminatorio de cada *locus*, teniendo en cuenta no sólo el número de alelos que se están expresando, sino también sus frecuencias relativas, tomando valores entre 0 (marcador monomórfico) y 1 (alelo altamente discriminatorio, con muchos alelos en iguales frecuencias). Por ejemplo, un *locus* marcador que presenta 5 alelos, pero en el que sólo un alelo se encuentre en alta frecuencia, tiene menos capacidad discriminatoria que un *locus* con cinco alelos con similares frecuencias.

3.4.2. ANÁLISIS CLUSTER

El análisis cluster de las líneas estudiadas se llevó a cabo en el software NTSys v.2.1 (Numerical Taxonomy System, 2000). Se calcularon las distancias genéticas entre todos los pares de líneas según el estimador de Nei (1972). Mediante el algoritmo matemático UPGMA, utilizando el módulo de SAHN del programa NTSys, se determinó la matriz de distancias genéticas a partir de la que se construyeron dendrogramas.

Los estimadores genéticos insesgados de Nei, estiman la frecuencia de la presencia o ausencia de un alelo en una población, a partir de la cual se obtiene una matriz de similitud o disimilitud, que indica la distancia genética intra e interpoblacional (Aguirre, 2009).

Existen diferentes métodos para la construcción de árboles filogenéticos a partir de la matriz de distancias. Los dos métodos más empleados son el Neighbour-Joining (NJ) y el UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages). El método UPGMA construye dendrogramas mediante sucesivos agrupamientos, bajo el criterio del promedio de la distancia de cada par. Weir (1996) lo definió como la distancia entre grupos, producto de todas las distancias entre pares de cada una de las combinaciones posibles (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005). La representación de las distancias en dendrogramas permite visualizar las similitudes entre líneas, por lo que es de gran utilidad en este estudio.

4. RESULTADOS

4.1. AMPLIFICACIÓN FRAGMENTOS SSR MEDIANTE PCR

Se caracterizaron 8 líneas LMM de maíz procedentes del MGCS (Universidad de Illinois), junto con dos líneas sintéticas del CIAM, una LMM y otra de fenotipo silvestre, con un total de 41 SSR *umc* localizados en los *bins* correspondientes a 5 genes de defensa de la planta (*HIR1*, *HIR2*, *HIR3*, *PR-1* y *PR-5*). En la figura 6 puede verse un ejemplo de los picos electroforéticos obtenidos en el secuenciador automático GeXP.

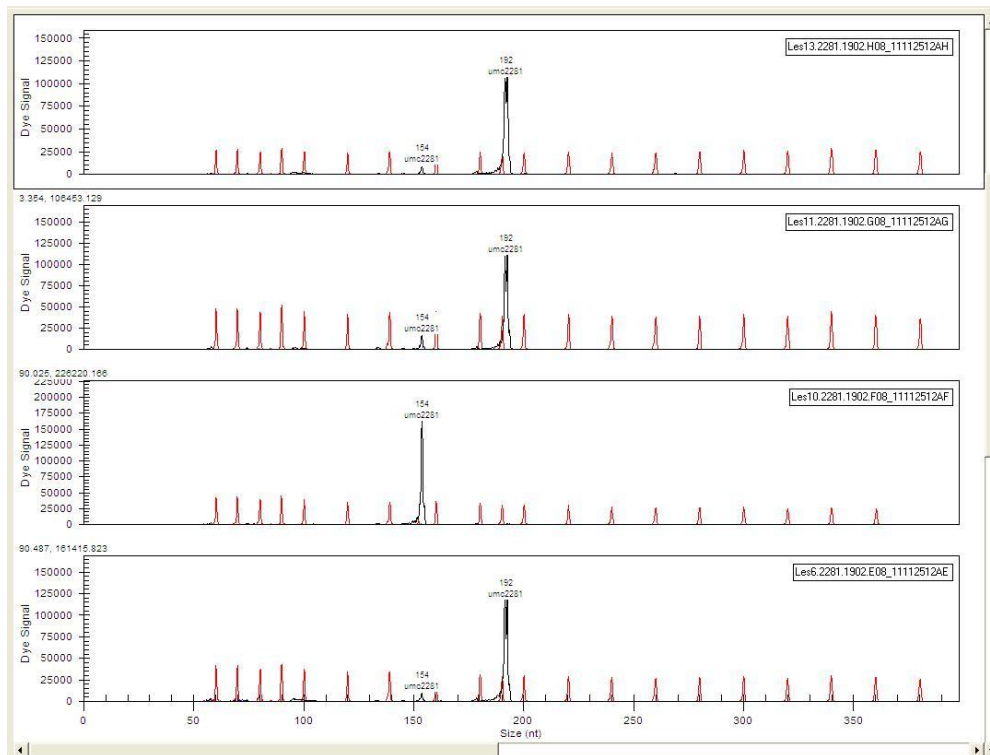


Figura 6. Electroferograma del marcador SSR *umc2281*, realizado en el secuenciador automático GeXP (Beckman Coulter, USA), en 4 líneas de maíz. El eje “y” representa la intensidad de fluorescencia, el eje “x” representa el tamaño del fragmento amplificado en pares de bases (pb).

Se estudiaron las diferencias a nivel genético y la existencia de marcadores polimórficos asociados a las zonas donde se localizan los genes de interés (Tabla 3). De los 41 SSR seleccionados, 11 fueron descartados por generar picos no analizables, 3 fueron monomórficos para las 10 líneas estudiadas y 27 fueron polimórficos entre líneas (Tabla 7).

Se realizó una prueba de normalidad de los datos, mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, en el paquete estadístico SPSS, comprobándose que no siguen una distribución normal (p -valor < 0,05).

Tabla 7. Alelos SSR obtenidos para las diferentes líneas y valor PIC de cada marcador.

SSR	l1s 1	Les 2	Les 3	Les 4	Les 6	Les 10	Les 11	Les 13	L8	L11	n° alelos	PIC
8-7	87	87	87	87	87	73,87	87	87	84	73,87	3	0,327
1-10	74,79	74,79	74,79	74,79	74,79	74,79	76	74	74,79	74,79	3	0,572
17-7	106	108	104	98,106	104,108	95,98	104,108	108	98	98	5	0,742
12-10	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	1	0
9-1	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	1	0
7-9	147	147	147	147	144	147	147	147	144	144	2	0,332
13-11	126,128	126,131	126	126	126,131	126,131	126,131	126,131	128	128	3	0,586
5-4	65	52,56	65	52	52	52	65	63	44	44	5	0,723
18-3	151	148	148	148,153	148,153	148	148,153	148,153	148	148	3	0,449
7-1	54,57	57,60	57,60	57,60	57,60	57,60	54,57	57,60	54,57	48,52	5	0,634
6-12	122,124	120,122	120,122	120,122	120,122	120,122	120,122	120,122	117,120	117,120	4	0,555
20-12	155	147,155	155	147,155	147	147,155	155	155	147	147	2	0,372
4-8	108	108	106,112	108,112	108,112	108	108	108	108	106	3	0,421
17-1	63	63	63	63	63	63	63	63	63	63	1	0
16-9	150,153	144	144,157	144	157,162	144	144,157	157,162	150,153	153	5	0,732
7-11	105,111	116	116	105,111	116	116	118	116,118	107,111	107,111	5	0,689
6-5	111	114	114	109,114	111	114,116	111	111	114	114	4	0,503
13-9	166	166	166	166	166	166	166	155	141	141	3	0,449
15-7	62	62	62	60	62	62	62	62	60	60	2	0,332
3-7	88	88	83,88	88	83,88	88	83,88	88	88	88	2	0,222
4-5	103	108	108	108	103,108	103	103,108	108	94	108	3	0,473
7-12	128,150	128	128,150	128	128	128	128	125,128	128	128	3	0,247
2-4	70,74	70,74	70,74	70,74	67,74	70,74	67,74	70,74	70,74	70,74	3	0,497
12-3	151,160	151,160	151,160	160	151,160	151,160	151,160	160	151	151	2	0,375
18-11	134	134	136	134	136	134,136	136	136	134,136	136	2	0,365
20-10	101,106	101,106	106	101,106	101,106	106	104,106	104,106	101,106	106	3	0,495
10-5	120,122	118	107,120	101,118	118	118	118	107,120	107,122	107,122	5	0,683
9-4	88	90	88	88	90	90	90	88,90	90	90	2	0,351
12-8	116,119	113,116	119,121	119,121	116,121	116,121	113,116	116,121	119,121	119,121	4	0,687
2281	192	154,192	192	154	154,192	154	154,192	154,192	154	154	2	0,365

Al comparar las medias de los LMMs con el fenotipo silvestre para cada marcador, mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney, se encontraron diferencias significativas en los *loci* microsatélite 13-9 (p-valor = 0,012), 15-7 (p-valor = 0,026), 4-8 (p-valor = 0,008), 5-4 (p-valor = 0,039), 7-1 (p-valor = 0,016) y 7-9 (p-valor = 0,026). Cuando se analizó la localización de estos marcadores, se observó una zona de especial significación en el *bin* 7,03, representada por los SSRs 5-4, 7-1 y 7-9, la cual se asocia con el gen *HIR2*. El resto de SSRs significativos no estaban relacionados entre sí, perteneciendo a *bins* y genes distintos: el SSR 13-9 pertenece al *bin* 1,06 y está asociado a *PR5*, el SSR 15-7 pertenece al *bin* 6,07/6,08 y está asociado a *HIR3*, mientras que el SSR 4-8 se localiza en el *bin* 2,6, asociado a *HIR2*.

Sin embargo, el estudio de las diferencias entre líneas mediante el mismo test (U Mann-Whitney), no reveló diferencias significativas entre ellas en base al polimorfismo de sus microsatélites ($p\text{-valor} > 0,05$).

Con la finalidad de establecer el poder discriminatorio de los SSRs analizados, se calculó el Contenido de Información Polimórfica (PIC) (Tabla 7). El número de alelos osciló entre 1 y 5, con una media de 3 alelos por *locus*. El valor PIC promedio para el conjunto de marcadores fue de 0,439. El valor PIC más alto lo presentó el marcador microsatélite 17-7 con un valor de 0,742, mientras que el menor valor PIC pertenece al marcador 3-7, con un valor de 0,222.

Los resultados mostraron la existencia de alelos específicos para cada una de las líneas, como se indica en la tabla 8. Estos alelos específicos, pueden ser evaluados en una planta para determinar si presenta o no fenotipo mutante y el tipo de LMM más probable al que pertenece.

Tabla 8. Alelos específicos para las líneas de maíz estudiadas.

Línea maíz	SSR	alelos	Línea maíz	SSR	alelos
Ils 1	17-7	106	Les 10	17-7	95, 98
	13-11	126, 128		6-5	114, 116
	18-3	151	Les 11	1-10	76
	6-12	122, 124		7-11	118
	10-5	120, 122	Les 13	1-10	74
	12-8	116, 119		5-4	63
Les 2	5-4	52, 56		7-11	116, 118
Les 3	17-7	104	13-9	155	
	4-8	106, 112	7-12	125, 128	
Les 4	17-7	98, 106	9-4	88, 90	
	6-5	109, 114	L8	8-7	84
	15-7	60		4-5	94
	10-5	101, 118	L11	7-1	48, 52
Les 6	7-9	144		4-8	106
				16-9	153

También se encontraron otros marcadores SSR capaces de discriminar las líneas del CIAM de las líneas del MGCSC: alelo 44 del SSR 5-4, alelos 107 y 111 del SSR 7-11 y alelo 141 del SSR 13-9.

4.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

En el maíz los genes *HIR* y *PR* se han relacionado con la respuesta hipersensible y la defensa de la planta. Para entender la relación entre LMM y respuesta hipersensible, se investigaron las

diferencias de expresión de los genes *HIR1*, *HIR2*, *HIR3*, *PR-1* y *PR-5* en diferentes líneas mutantes de maíz. El análisis de expresión se realizó mediante qRT-PCR en dos pasos. Los datos se normalizaron para la expresión del gen *GADPH* y se relativizaron para L11, fenotipo silvestre, y L8, línea LMM del CIAM, para hacer las correspondientes comparaciones entre los niveles de expresión. En el caso de *PR-5*, se calculó la expresión génica absoluta, por no haber expresión de este gen en L11 ni L8. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7.

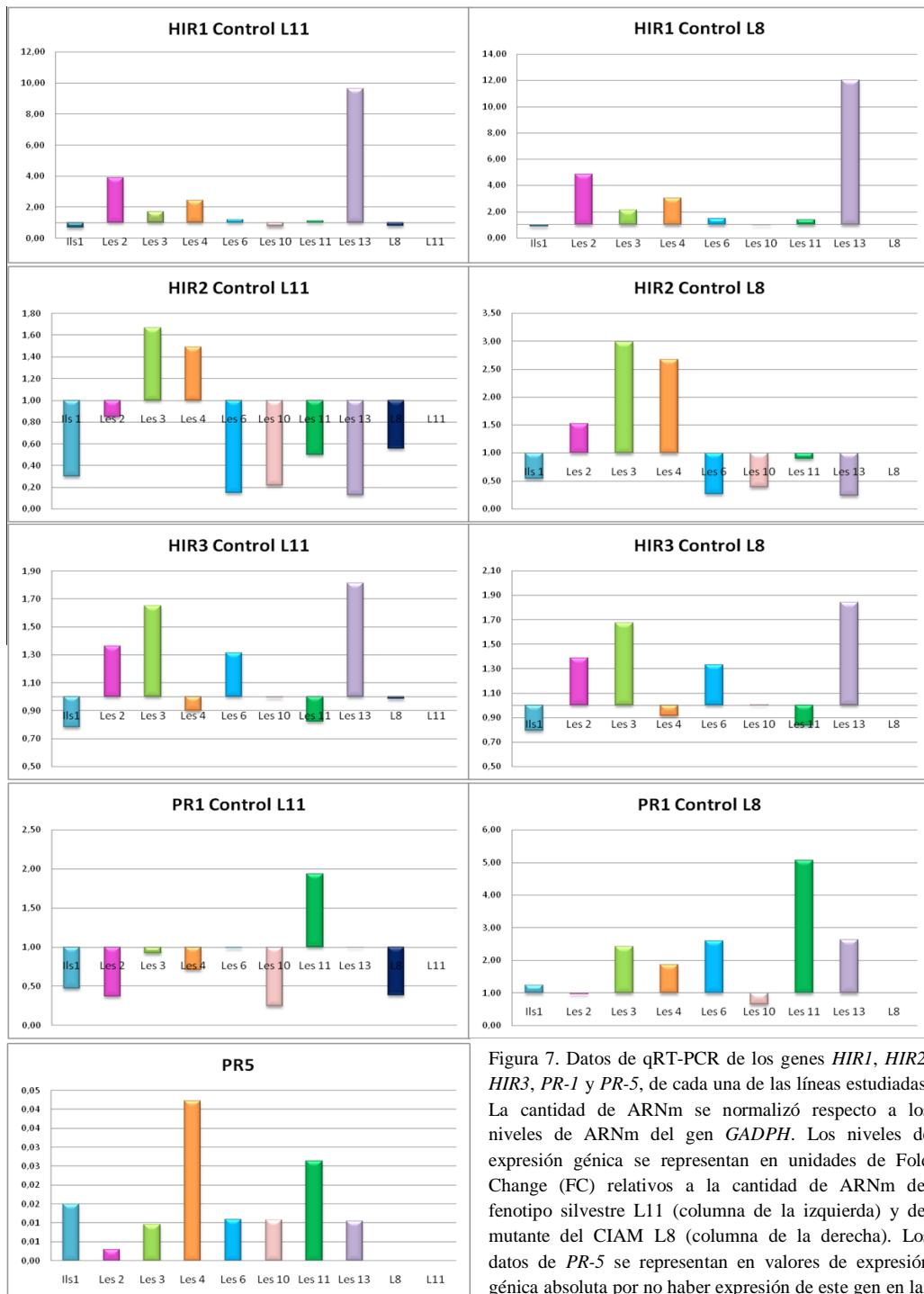


Figura 7. Datos de qRT-PCR de los genes *HIR1*, *HIR2*, *HIR3*, *PR-1* y *PR-5*, de cada una de las líneas estudiadas. La cantidad de ARNm se normalizó respecto a los niveles de ARNm del gen *GADPH*. Los niveles de expresión génica se representan en unidades de Fold Change (FC) relativos a la cantidad de ARNm del fenotipo silvestre L11 (columna de la izquierda) y del mutante del CIAM L8 (columna de la derecha). Los datos de *PR-5* se representan en valores de expresión génica absoluta por no haber expresión de este gen en las líneas L11 y L8.

La expresión de *HIR1* entre L8, Les6, Les10 y Les11 con respecto al fenotipo silvestre es muy similar ($\pm 0,2$ FC -Fold Change). Mientras que en IIs1 el gen está ligeramente subexpresado, en los mutantes Les13, Les2, Les4 y Les3 se sobreexpresó. La sobreexpresión fue mucho mayor en Les13 que en cualquier otro mutante, con un FC de 9,65. En comparación con L8, los mutantes IIs1 y Les10 mostraron niveles similares de expresión de *HIR1*. Sin embargo, Les13, principalmente, y Les2, Les4 y Les3, en menor grado, expresan más el gen que el mutante L8.

El gen *HIR2* se sobreexpresa en Les3 y Les4 (1,67 y 1,49 FC, respectivamente). En el resto de los LMM hay subexpresión del gen, estando más acusada en Les13, Les6, Les10 e IIs1 (0,13, 0,15, 0,22 y 0,30 FC, respectivamente). Por otra parte, se observó que el gen *HIR2* se expresa casi 3 veces más en Les3 y Les4 que en L8, siendo Les11 la línea con expresión de *HIR2* más similar a éste último.

En Les13, Les3, Les2 y Les6 el gen *HIR3* está sobreexpresado (1,81, 1,65, 1,36, y 1,31 FC, respectivamente), se subexpresó en IIs1 y Les11 (0,78 y 0,82 FC) y tuvo expresión similar en Les10, L8 y Les4, en comparación con el fenotipo silvestre. Esto mismo ocurre cuando se comparan los diferentes LMM y L8, ya que L11 y L8 mostraron niveles de *HIR3* similares.

En lo referente a las proteínas relacionadas con la patogénesis, se observaron niveles basales de expresión del gen *PR-1* y *PR-5*, excepto en las líneas L8 y L11 donde no hubo expresión de *PR-5*.

Si se compara con el fenotipo silvestre, *PR-1* sólo se sobreexpresa en Les11. Los mayores niveles de subexpresión aparecen en los mutantes Les10, Les2, L8 e IIs1. Teniendo en cuenta la expresión en L8, puede decirse que *PR-1* está más expresada en todas las líneas, con excepción de Les10, donde el gen se subexpresa ligeramente y Les2, en el que los niveles de ARNm son similares.

En las líneas del CIAM, L11 y L8, el gen *PR-5* no se expresa y en el resto de líneas, los niveles de expresión son muy bajos. En términos de expresión absoluta, Les 4 (0,042 FC) fue el LMM con mayor expresión de *PR-5*, seguido por Les11 (0,026 FC) e IIs1 (0,015 FC), mientras que Les2 fue el de menor expresión (0,003 FC). Los niveles encontrados en Les3, Les6, Les10 y Les13 son muy similares ($\sim 0,010$ FC).

En general, Les13, Les3 y Les2 son los tres LMM con mayor inducción de la expresión de los genes *HIR*, Les11 de los genes *PR* y Les4 del gen *PR-5*, en particular.

Se estudió la normalidad de los datos, mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, para un nivel de significación $\alpha=0,01$, comprobándose que se ajustan a una distribución normal. La comparación

de las medias de cada uno de los genes estudiados, mediante el test T de Student, reveló diferencias significativas entre líneas (p-valor < 0,05).

4.3. ANÁLISIS CLUSTER

Se han calculado y representado gráficamente, en árboles UPGMA, las distancias genéticas considerando sólo los marcadores microsatélite, sólo los marcadores de expresión y el total de marcadores analizados. Las distancias genéticas obtenidas con todos los marcadores y con los marcadores microsatélite únicamente, así como sus dendrogramas, han resultado ser muy similares, por lo que sólo se representa el dendrograma obtenido a partir de todos los marcadores (Figura 8).

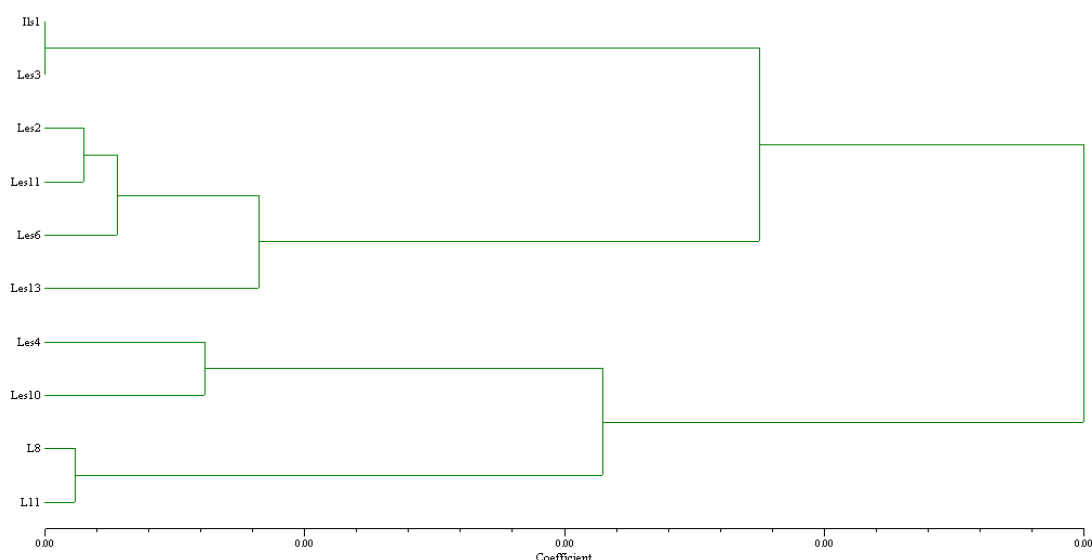


Figura 8. Dendrograma resultante del análisis cluster de 10 líneas de maíz con 30 marcadores microsatélite y 9 marcadores de expresión, obtenidos por el método UPGMA y utilizando el estadístico de Nei (1972) como estimador de las distancias genéticas entre grupos.

En este caso, el análisis cluster indica que las líneas pueden dividirse en dos grandes grupos en función de su similitud. El primer grupo, a su vez se divide en dos subgrupos. El primero de ellos comprendería a las líneas IIs1 y Les3, encontrándose al mismo nivel y, por lo tanto, siendo las líneas más similares entre sí. El siguiente subgrupo, estaría formado, en orden de similitud, por Les2, Les11, Les6 y Les13. El segundo grupo, también se divide en dos subgrupos, uno formado por Les4 y Les10, mientras que el otro, más distante con el primer grupo, incluiría a L8 y L11.

Los grupos obtenidos en el dendrograma construido a partir de los datos de expresión génica (Figura 9), difieren de los anteriores. Hay dos grupos definidos y separados entre sí, estando Les2

y Les13 por un lado, y el resto de líneas por el otro. En el grupo de mayor tamaño, Les 11 es la más alejada y, por tanto, la que presenta más diferencias de expresión. IIs1, Les6 y Les10 formarían un pequeño subgrupo y Les13, L8, L11 y Les4 otro. En este caso, las líneas más similares entre sí son Les3 y L8, mientras que, cuando se tuvieron en cuenta todos los marcadores, la línea más próxima a Les3 fue IIs1 y L11, la más próxima a L8.

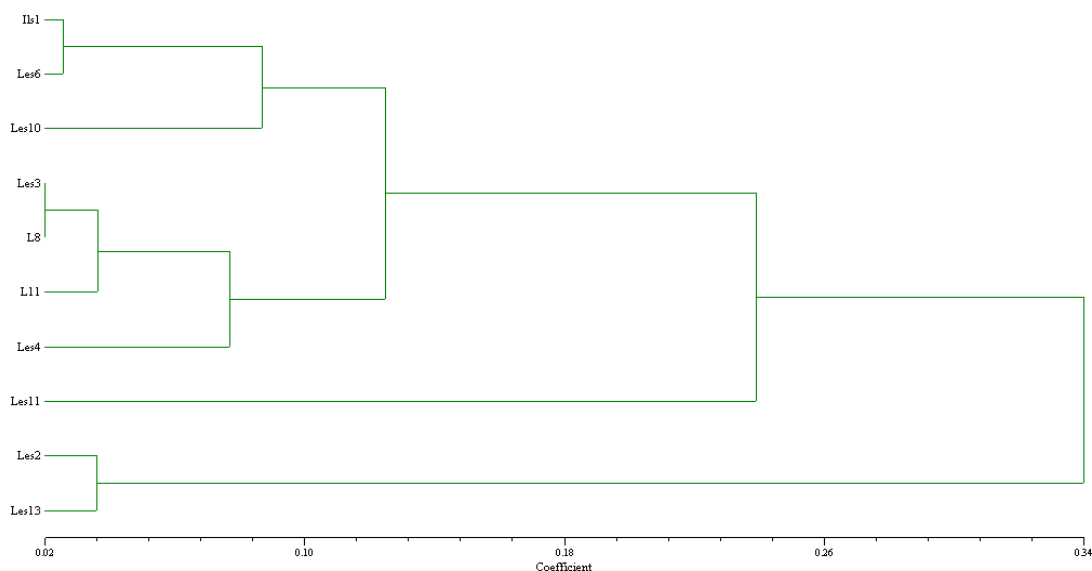


Figura 9. Dendrograma resultante del análisis cluster de 10 líneas de maíz con 9 marcadores de expresión, obtenidos por el método UPGMA y utilizando el estadístico de Nei (1972) como estimador de las distancias genéticas entre grupos.

Las distancias genéticas obtenidas considerando todos los marcadores van desde $3,731 \times 10^{-4}$ a $3,207 \times 10^{-3}$, con una media de $1,694 \times 10^{-3}$. Cuando se tiene en cuenta sólo los marcadores de expresión, la distancia genética media es del orden de 0,205 (120 veces superior a la anterior media), siendo la distancia máxima de 0,715 y la mínima de $2,302 \times 10^{-2}$. Por lo tanto, los valores de distancia genética con los marcadores de expresión son mayores a los obtenidos con los marcadores microsatélite.

8. DISCUSIÓN

Los LMM son poderosas herramientas para el estudio de las rutas de muerte celular y defensa de las plantas (Bouchez *et al.*, 2007). Las lesiones que manifiestan este tipo de mutantes pueden tener diversas causas, como son la producción impropia de señales asociadas al ataque de patógenos, alteraciones de los genes de resistencia a enfermedades o defectos en las rutas de muerte celular (Yin *et al.*, 2000). En el maíz, se han identificado y caracterizado numerosos

LMM, llegando a sugerirse la existencia de más de 200 posibles *loci* causantes de mutaciones LM en esta especie (Johal *et al.*, 1995). Además, muchos de los LMM de maíz poseen características similares a los LMM de *Arabidopsis thaliana*: desarrollan lesiones similares a las producidas durante la RH, muestran un gran aumento de los niveles de expresión de los genes *PR-1* y *PR-5* y acumulan grandes cantidades de SA, tanto libre como conjugado. Mientras que los LMM de *Arabidopsis* son resistentes a enfermedades, el fenotipo de resistencia en los mutantes de maíz todavía no está establecido, con la excepción de la línea *RPI recombination lesión mimic* que es resistente a todos los hongos aislados (Morris *et al.*, 1998).

Las mutaciones en los LMM que dan lugar a un aumento de la resistencia, constituyen una fuente de resistencia efectiva, duradera y de amplio espectro (Campos *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2009). La mejora vegetal enfocada hacia una mayor resistencia reduce la cantidad de productos químicos necesaria para el control de plagas y enfermedades que afectan a los cultivos, siendo una estrategia más respetuosa con el medio ambiente y que contribuye al desarrollo de una agricultura más sostenible. Sin embargo, la aplicación práctica de los LMM en mejora presenta algunos problemas. Por una parte, la resistencia a enfermedades que confieren a la planta es parcial y, por otra parte, la mayoría de los mutantes poseen características anormales de crecimiento, floración, formación de mazorcas, etc., por lo que su uso va a depender de la posibilidad de paliación de los efectos pleiotrópicos no deseados (Yin *et al.*, 2000).

En este estudio se investigó la expresión de los genes *Zm-hir1*, *Zm-hir2*, *Zm-hir3*, *PR-1* y *PR-5*, así como los posibles marcadores SSR asociados a sus secuencias, en diferentes líneas LMM de maíz. Hasta el momento, no se han publicado mapas con las posiciones cromosómicas de los genes *HIR* y *PR* en el maíz, por lo que han sido deducidas *in silico* a partir del alineamiento de las secuencias en las bases de datos del maizeGDB y www.sequence.org, o por sintenia de los genes mapeados en otras especies de monocotiledóneas con el maíz. Por lo tanto, todavía es necesaria la confirmación de las posiciones cromosómicas de los genes de este estudio.

La disponibilidad de densos mapas genéticos de SSRs para cereales tales como la cebada, el maíz, el arroz y el trigo proporciona una gran variedad de marcadores a elegir y una alta probabilidad de encontrar marcadores polimórficos que representen la región cromosómica de interés (Hayden *et al.*, 2008).

El análisis estadístico de los SSRs analizados no reveló diferencias significativas entre líneas, lo que refleja la poca diversidad genética presente en los genes estudiados. Probablemente, las

diferencias entre fenotipos estén determinadas por mutaciones en otros genes o por diversas alteraciones fisiológicas. Los análisis cluster y de expresión génica apoyan esta idea.

Pese a la baja diversidad genética encontrada, los marcadores SSRs utilizados fueron capaces de discriminar las 10 líneas estudiadas entre sí y en base a su origen. Esto se puede explicar por el alto poder de resolución y la gran cantidad de información que poseen los microsatélites, permitiendo la caracterización de las líneas, aunque no se observen diferencias significativas globales entre ellas. La buena capacidad de discriminación de los SSRs estudiados es una característica especialmente interesante por su posible utilidad en la identificación temprana y eficaz de los diferentes LMMs. Esto pone de manifiesto la importancia de esta herramienta en estudios de identificación genotípica, mapeo genético y MAS (mejora asistida por marcadores).

Por otro lado, cuando se compararon las medias de cada *locus* SSR entre LMMs y el fenotipo silvestre, se encontró un *bin* muy significativo asociado al gen *HIR2*, representado por los SSRs umc1718, umc1134 y umc1324: el *bin* 7,03. Esta posición fue deducida por sintenia del marcador RZ422 del cromosoma 9 del arroz con el cromosoma 7 del maíz. En el arroz, esta región coincide con un QTL de resistencia a enfermedades (Ramalingam *et al.*, 2003), mientras que en el maíz, este *bin* se asoció a QTLs de resistencia a diversas enfermedades: la roya común (*common rust*), el tizón común (*common smut*) y el tizón norteño (*northern corn leaf blight*) (Welz y Geier, 2000). La co-localización de genes de respuesta de defensa (genes DR) con genes o QTLs de resistencia también se observó en otros trabajos publicados (Ramalingam *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007). Se considera que estos genes pueden ser los responsables de las propiedades características de los QTLs de resistencia y que actuarían *downstream* a los genes R, siendo regulados por una o varias rutas de transducción de señal (Wang *et al.*, 2007).

El *bin* 7,03 también se ha relacionado con la biosíntesis del ácido abscísico (ABA) (Capelle *et al.*, 2010). En un estudio reciente (Wang *et al.*, 2010), la aplicación exógena de esta fitohormona en hojas de trigo, indujo la expresión moderada de la proteína PR-5. Fan *et al.*, (2009) obtuvieron resultados similares en *Arabidopsis*, donde el tratamiento con ABA incrementó la resistencia de las plantas frente a patógenos necrotróficos (*Alternaria brassicicola*) y aumentó la susceptibilidad a patógenos biotróficos (*Pseudomonas syringae* y *Hyaloperonospora arabidopsis*). Aunque la función específica de PR-5 todavía no se conoce completamente, se ha visto que algunos miembros de este grupo de proteínas juegan un papel en la defensa contra hongos patógenos, sin embargo, su expresión no es un prerrequisito para que tenga lugar la RH. Se ha propuesto que la actividad antifúngica de este gen está relacionada con la permeabilidad de

la membrana plasmática por su unión a componentes de la pared celular, como los (1,3)- β -D-glucanos.

Hasta el momento, diferentes estudios se han centrado en la relación entre la formación de lesiones típicas de RH, la expresión de los genes *HIR*, la acumulación de ácido salicílico (SA) y la expresión de los genes *PR*, tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas. También se está estudiando el papel que desempeñan el etileno (Et) y el ácido jasmónico (JA) en la resistencia sistémica inducida (ISR) (Bouchez *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010). Sin embargo, el papel que desempeñan otras fitohormonas, como el ABA, en el control de la muerte celular y la respuesta de defensa no se conoce tan bien, ofreciendo nuevas líneas de investigación en las que los LMM son herramientas clave.

El estudio de las diferencias de expresión génica entre líneas mutantes y silvestres y entre los mutantes de la Universidad de Illinois y el mutante del CIAM, contribuye al conocimiento del posible papel que desempeñan los genes *HIR* y *PR* en la respuesta hipersensible y cómo se ven afectados por las mutaciones que definen a cada uno de los LMM.

Los niveles de proteínas *HIR* se correlacionan con la muerte localizada de las células huésped y las respuestas de defensa (Zhou *et al.*, 2010), pudiendo utilizarse como marcadores de la activación de la respuesta hipersensible en plantas. En este estudio se observó un gran aumento del gen *HIR1* en Les13 (aprox. 10 FC) y Les2 (aprox. 4 FC). En el resto de líneas, la subexpresión o sobreexpresión de los genes fue menor a 2 FC con respecto al fenotipo silvestre. Sin embargo, en estudios previos realizados en mutantes de maíz (Nadimpalli *et al.*, 2000) y cebada (Rostoks *et al.*, 2003), el gen más sobreexpresado fue *HIR3*.

La SAR es una respuesta de resistencia general de la planta que le confiere un aumento de la resistencia de amplio espectro contra diversos patógenos. La expresión de las proteínas PR-1 y PR-5 son marcadores de SAR en plantas (Morris *et al.*, 1998). Aunque en otros trabajos publicados, la expresión de los genes *HIR* estuvo acompañada de un aumento de las proteínas PR (Karrer *et al.*, 1998; Jung y Hwang, 2007; Choi *et al.*, 2011), en este experimento no fue así, habiéndose encontrado niveles basales de expresión en la mayoría de los casos. Esto podría deberse a que el material vegetal empleado es muy joven (estadio de 3-4 hojas) y, en muchos casos, todavía no ha desarrollado completamente las lesiones. La expresión de los genes implicados en la respuesta de defensa depende del estado fisiológico del mismo y del tipo de LMM al que pertenezca, ya que no todas las lesiones aparecen a la vez en todos los mutantes (Takahashi *et al.*, 1999). Numerosos estudios indican que la respuesta de defensa se desencadena

tras la aparición de lesiones en las hojas de los mutantes (Dietrich *et al.*, 1994; Morris *et al.*, 1998; Takahaski *et al.*, 1999). Por el contrario, en otros mutantes, como el *Cdr3* del arroz (Takahaski *et al.*, 1999) y el *mlo* de la cebada (Walter *et al.*, 1993), la resistencia al hongo de la roya es independiente de la formación de lesiones.

El análisis cluster realizado con los datos combinados de SSRs y de expresión génica, fueron muy similares a los hechos sólo con los datos de SSR. Esto puede ser debido a que el número de marcadores SSR fue mucho mayor que el de marcadores de expresión. Sin embargo, otra posible explicación sería que las mayores diferencias entre líneas se deben a diferencias en la expresión de los genes y no a mutaciones en la secuencia de dichos genes. Esta última posibilidad está apoyada por el análisis estadístico de los datos, donde no se encontraron diferencias entre líneas en función de los SSRs, pero sí se encontraron diferencias significativas entre líneas en función de la expresión de cada uno de los genes. De ser así, las diferencias entre mutantes se darían a nivel de las secuencias reguladoras de los genes de este estudio o a nivel celular, pero no a nivel de su secuencia.

Este estudio contribuye al conocimiento de la estructura genética de las líneas LMM de maíz estudiadas, constituyendo una base de partida para el diseño de futuras investigaciones sobre la respuesta hipersensible, la resistencia a enfermedades y de posibles programas de selección y mejora de plantas de maíz.

9. CONCLUSIONES

- De los 41 marcadores SSR seleccionados sólo 27 resultaron polimórficos para las líneas mutantes de maíz. Los SSRs que han resultado ser polimórficos podrían utilizarse en programas de mejora o en estudios genéticos tales como el mapeo de genes o QTLs involucrados en los mecanismos de defensa de la planta, para la aplicación en selección asistida por marcadores (MAS) y caracterización de germoplasma de maíz.
- Los datos obtenidos a partir de los marcadores de expresión sugieren que los mutantes posiblemente presentan alteraciones fisiológicas en rutas metabólicas clave o en reguladores de los genes estudiados y, por lo tanto, en reguladores de la respuesta hipersensible. Sin embargo, en el caso de *HIR2*, se han observado diferencias significativas a nivel de secuencia entre los mutantes y el fenotipo silvestre, especialmente en el *bin 7,03*, el cual debería ser estudiado en más profundidad.

7. REFERENCIAS

- Aranguren-Méndez, J. A.; Román-Bravo, R.; Isea, W.; Villasmil, Y.; Jordana, J. 2005. Los microsatellites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal 13(1): 1-6.
- Aguirre Robert, C. J. 2009. Marcadores moleculares de secuencias simples repetidas en la caracterización de *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum*, *Lolium hybridum* y *Dactylis glomerata*. Tesis de grado. Colegio de Postgraduados. Méjico. 74 p.
- Ahn, S.; Tanksley, S. D. 1993. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 90: 7980-7984.
- Botstein, D.; White, R. L.; Skolnick, M.; Davis, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics 32: 314-331.
- Bouchez, O.; Huard, C.; Lorrain, S.; Roby, D.; Balagué, C. 2007. Ethylene Is One of the Key Elements for Cell Death and Defense Response Control in the *Arabidopsis* Lesion Mimic Mutant *vad1^{l/w}*. Plant Physiology 145: 465-477.
- Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology 25: 169-193.
- Caldana, C.; Sceible, W.-R.; Mueller-Roeber, B.; Ruzicic, S. 2007. A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. Plant Methods 3: 7-15.
- Capelle, V.; Remoué, C.; Moreau, L.; Reyss, A.; Mahé, A.; Massonneau, A., Falque, M.; Charcosset, A.; Thévenot, C.; Rogowsky, P.; Coursol, S.; Prioul, J.-L. 2010. QTLs and candidate genes for desiccation and abscisic acid content in maize kernels. Plant Biology 10: 2.
- Campos, T.; Lasry Benchimol, L.; Moraes Carbonell, S. A.; Fernando Chioratto, A.; Fernandes Formighieri, E.; Pereira de Souza, A. 2007. Microsatellites for genetic studies and breeding programs in common bean. Pesquisa agropecuária brasileira 42(4): 589-592.
- Chintamanani, S.; Hulbert, S. H.; Johal, G. S.; Balint-Kurti, P. J. 2010. Identification of a maize *Locus* That Modulates the Hypersensitive Defense Response, Using Mutant-Assisted Gene Identification and Characterization. Genetics 184: 813-825.

- Choi, H. W.; Kim, Y. J.; Hwang, B. K. 2011. The Hypersensitive Induced Reaction and Leucine-Rich Repeat Proteins Regulate Plant Cell Death Associated with Disease and Plant Immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(1): 68-78.
- Collins, N. C.; Webb, C. A.; Seah, S.; Ellis, J. G.; Hulbert, S. H.; Pryor, A. 1998. The Isolation and Mapping of Disease Resistance Gene Analogs in Maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11(10): 968-978.
- Cubero, J. I. 1999. *Introducción a la mejora genética vegetal*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 567 p.
- Czechowski, T.; Bari, R. P.; Stitt, M.; Scheible, W.-R.; Udvardi, M. K. 2004. Real-Time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *The Plant Journal* 38: 366-379.
- Dietrich, R. A.; Delaney, T. P.; Uknes, S. J.; Ward, E. R.; Ryals, J. A.; Dangl, J. L. 1994. *Arabidopsis* Mutants Simulating Disease Resistance Response. *Cell* 77: 565-577.
- Doyle, J. J.; Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Fan, J.; Hill, L.; Crooks, C.; Doerner, P.; Lamb, C. 2009. Abscisic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. *Plant Physiology* 150: 1750-1761.
- Hayden, M. J.; Nguyen, T. M.; Waterman, A.; McMichael, G. L.; Chalmers, K. J. 2008. Application of multiplex-ready PCR for fluorescence-based SSR genotyping in barley and wheat. *Molecular Breeding* 21: 271-281.
- Johal, G. S.; Hulbert, S. H.; Briggs, S. P. 1995. Disease lesion mimics of maize: a model for cell death in plants. *BioEssays* 17(8): 685-692.
- Jung, H. W.; Hwang, B. K. 2007. The leucine-rich repeat (LRR) protein, CaLRR1, interacts with the hypersensitive induced reaction (HIR) protein, CaHIR1, and suppresses cell death induced by the CaHIR1 protein. *Molecular Plant Pathology* 8(4): 503-514.
- Karrer, E. E.; Beachy, R. N.; Holt, C. A. 1998. Cloning of tobacco genes that elicit the hypersensitive response. *Plant Molecular Biology* 36: 681-690.
- Korzun, V. 2003. Molecular markers and their applications in cereals breeding. En: *Markers Assisted Selection: A fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding. Session I: MAS in plant*. FAO: Electronic Forum on Biotechnology in Food and Agriculture. p. 18-22.

- Lagrimini, L. M.; Burkhart, W.; Moyer, M.; Rothstein, S. 1987. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: Molecular analysis and tissue specific expression. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 84: 7542-7546.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* 25: 402-408
- Li, W. L.; Faris, J. D.; Chittoor, J. M.; Leach, J. E.; Hulbert, S. H.; Liu, D. J.; Chen, P. D.; Gill, B. S. 1999. Genomic mapping of defense response genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 226-233.
- Liu, Q.; Xue, Q. 2006. Computational identification of novel PR-1-type genes in *Oryza sativa*. *Indian Academy of Science* 85(3): 193-198.
- Luo, M.; Liu, J.; Lee, R. D.; Guo, B. Z. 2008. Characterization of gene expression profiles in developing kernels of maize (*Zea mays*) inbred *Tex6*. *Plant Breeding* 127: 569-578.
- Morel, J.-B.; Dangl, J. L. 1997. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death and Differentiation* 4: 671-683.
- Morris, S. W.; Vernooij, B.; Titatarn, S.; Starrett, M.; Thomas, S.; Wiltse, C. C.; Frederiksen, R. A.; Bhandhufalck, A.; Hulbert, S.; Uknes, S. 1998. Induced Resistance Responses in Maize. *The American Phytopathological Society* 11(7): 643-658.
- Muthukrishnan, S.; Liang, G. H.; Trick, H. N.; Gill, B. S. 2001. Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 93-114.
- Nadimpalli, R.; Yalpani, N.; Johal, G. S.; Simmons, C. R. (2000) Prohibitins, Stomatins, and Plant Disease Response Genes Compose a Protein Superfamily That Controls Cell Proliferation, Ion Channel Regulation, and Death. *The Journal of Biological Chemistry* 275(38): 29579-29586.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106(949): 283-292.
- Penning, B. W.; Johal, G. S.; McMullen, M. D. 2004. A major suppressor of cell death, *slm1*, modifies the expression of the maize (*Zea mays* L.) lesion mimic mutation *les23*. *Genome* 47: 961-969.
- Prasanna, B. M.; Hoisington, D. 2003. Molecular Breeding for Maize Improvement: An Overview. *Indian Journal of Biotechnology* 2: 85-98.

- Ramalingam, J.; Vera Cruz, C. M.; Kukreja, K.; Chittoor, J. M.; Wu, J.-L.; Lee, S. W.; Baraoidan, M.; George, M. L.; Leach, J. E.; Leung, H. 2003. Candidate Defense Genes from Rice, Barley and Maize and Their Association with Qualitative and Quantitative Resistance in Rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16(1): 14-24.
- Rostocks, N.; Schmierer, D.; Kudrna, D.; Kleinhofs, A. 2003. Barley putative hypersensitive induced reaction genes: genetic mapping, sequence analyses and differential expression in disease lesion mimic mutants. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1094-1101.
- Salleres, M. B. 2010. Utilización de marcadores moleculares para la selección y disección de caracteres cuantitativos en maíz grano y forrajero en las zonas húmedas de España. Tesis doctoral. Universidad de A Coruña.
- Schlatter, A. R.; Eyhérbide, G.; Presello, D.; Álvarez, M. P.; Ornella, L.; Iglesias, J. (2004) Marcadores Moleculares en Maíz. *IDIA XXI* 4(6):111-113.
- Sharma, A.; Namdeo, A. G.; Mahadik, K. R. 2008. Molecular Markers: New Prospects in Plant Genome Analysis. *Pharmacognosy Reviews* 2(3): 23-34.
- Takahashi, A.; Kawasaki, T.; Henmi, K.; Shii, K.; Kodama, O.; Satho, H.; Shimamoto, K. 1999. Lesion mimic mutants of rice whit alterations in early signaling events of defense. *The Plant Journal* 17(5): 535-545.
- Van Loon, L. C.; Rep, M.; Pieterse, C. M. J. 2006. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *The Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162.
- Wang, G.-X.; Chen, Y.; Zhao, J.-R.; Li, L.; Korban, S. S.; Wang, F.-G.; Li, J.-S.; Dai, J.-R.; Xu, M.-L. 2007. Mapping of Defense Response Gene Homologs and Their Association with Resistance *Loci* in Maize. *Journal of Integrative Plant Biology* 49(11): 1580-1598.
- Wang, X.; Tang, C.; Deng, L.; Cai, G.; Liu, X.; Liu, B.; Han, Q.; Buchenauer, H.; Wei, G.; Han, D.; Huang, L.; Kang, Z. 2010. Characterization of pathogenesis-related thaumatin-like protein gene TaPR5 from wheat induced by stripe rust fungus. *Physiologia Plantarum* 139: 27-38.
- Weir, B. S. (1996) *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetics Data*. Sinauer Associates, INC. Publishers, Sunderland, Massachusetts. 283 p.
- Welz, H. G.; Geiger, H. H. (2000) Genes for resistance to northern corn leaf blight in diverse maize populations. *Plant Breeding* 119: 1-14.

- Wolter, M.; Hollricher, K.; Salamini, F.; Schulze-Lefert, P. 1993. The *mlo* resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defence mimic phenotype. *Molecular Genetics & Genomics* 239: 122-128.
- Wong, M. L.; Medrano, J. F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39(1): 1-11.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29(9): 2002-2007
- Yao, Q.; Zhou, R.; Fu, T.; Wu, W.; Zhu, Z.; Li, A.; Jia, J. 2009. Characterization and mapping of complementary lesion-mimic genes *lm1* and *lm2* in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 119: 1005-1012.
- Yin, Z.; Chen, J.; Zeng, L.; Goh, M.; Leung, H.; Khush, G. S.; Wang, G.-L. 2000. Characterizing Rice Lesion Mimic Mutants and Identifying a Mutant with Broad-Spectrum Resistance to Rice Blast and Bacterial Blight. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(8): 869-876.
- Yu, X.-M.; Yu, X.-D.; Qu, Z.-P.; Huang, X.J.; Guo, J.; Han, Q.-M.; Zhao, J.; Huang, L.-L.; Kang, Z.-S. 2008. Cloning of a putative hypersensitive induced reaction gene from wheat infected by stripe rust fungus. *Gene* 407: 193-198.
- Zhang, G.; Dong, Y.-L.; Zhang, Y.; Li, Y.-M.; Wang, X.-J.; Han, Q.-M.; Guo, J.; Huang, L.-L.; Kang, Z.-S. 2009. Cloning and Characterization of a novel Hypersensitive-induced Reaction Gene from wheat Infected by Stripe Rust Pathogen. *Journal of Phytopathology* 157: 722-728.
- Zhang, G.; Li, Y.-M.; Sun, Y.-F.; Wang, J.-M.; Liu, B.; ZHAO, J.; Guo, J.; Huang, L.-L.; Chen, X.-M.; Kang, Z.-S. 2011. Molecular characterization of a gene induced during wheat hypersensitive reaction to stripe rust. *Biologia Plantarum* 55(4): 696-702.
- Zheng, J.; Fu, J.; Gou, M.; Huai, J.; Liu, Y.; Jian, M.; Huang, Q.; Guo, X.; Dong, Z.; Wang, H.; Wang, G. 2010. Genome-wide transcriptome analysis of two maize inbred lines under drought stress. *Plant Molecular Biology* 72: 407-421.
- Zhou, L.; Cheung, M.-Y.; Li, M.-W.; Fu, Y.; Sun, Z.; Sun, S.-M.; Lam, H.-M. 2010. Rice Hypersensitive Induced Reaction Protein 1 (OsHIR1) associates with plasma membrane and triggers hypersensitive cell death. *Plant Biology* 10: 290-299.

ANEXO 1. Secuencias de los primers de los marcadores SSR utilizados en el estudio y algunas de sus características.

Código CIAM	BIN	Código missouri	Repetición SSR	Tamaño amplicón (estimado)	Secuencia Primers (F/R)	TM (F/R)
1-1	8,08	p-umc1933	(CCA)6	114	CGGAAAGACATGAAGCACACTATG // CACGGAGAAAGTGGGTCTATATGC	55,5//57,2
2-4	7	p-umc1545	(AAGA)4	80	GAAACTGCATCAACAACAAGCTG // ATTGGTTGGTTCCTTGTCCATTA	53,8//52,1
3-7	6,08	p-umc2059	(CAG)8		GGAAAAGGAGGAACAGTGTAAAGCA // AGCGTGATCAGACGTACAATGCTA	55,5//55,5
4-3	1,06	p-umc1590	(AAGGAG)5	145	CAGAGTCTGATAGTCCGAACCCAG // GTAAAGCTCACAGTTCGGACAG	58,9//56,9
4-5	7	p-umc1788	(AAAAT)4	112	CACTAATTGCTACCAGGAGATCCAAA // AAGTCAGTGAAGCGCTGAGTTTTT	54,7//53,8
4-8	2,06	p-umc1156	(AAT)4	112	GCTGTGACGTTTGCTACTACTCCA // TAGCTATGCCATGCGCCGTGATAA	57,2//55,5
5-4	7,03	p-umc1718	(ACT)5	81	TGAAGGACATACACCAATCCTCAA // ACTAGTAAGGTGCATTTCCAACGC	53,8//55,5
6-5	4,04	p-umc1821	(AGT)4	116	CAGACCATCTCTACTCGCAAAT // TTTTCCCGTTATTAGTAGCGAT	55,1//53,8
6-12	6,01	p-umc2074	(CCG)5		ACACGGAGATGACAGACGCC // GTTGCCGAAGATGTTGTACTGGAT	55,7//55,5
7-1	7,03	p-umc1134	(AGC)6	86	AAAACACTAACAGGCAGCAGACCAAC // ATCAGCAAGTGACTGAATTCCTCC	55,5//55,5
7-3	4,03	p-umc2176	(TGC)4	149	ATAGATCTTTGTCGCGTGTCTGC // CTCAAGAACCACCAGACGAGTT	55,5//57,2
7-9	7,03	p-umc1324	(AGC)5	150	ATCCATCATCATCATCTGCTTG // ATGTCATCATGTACCAGGTGTGG	52,1//55,5
7-11	6,07	p-umc1779	(TCG)4	118	AGGAGTACGGTCGCACGTT // GCTGCTGCTGGTTGTGATAGC	55,7//56,1
7-12	1,11	p-umc1118	(GAGCA)4	150	ATCAGATCCGAAGGTCCATAAT // GTAGTGAAATGAATCGTGAGAGCG	53,8//55,5
8-7	1,11	p-umc1111	(CAAAA)4	88	CTACAGCCTTCTTTTTGGTGGAGA // TGACTTTAGCCGTTTCCATTTTC	55,5//53,8
9-1	4,05	p-umc1346	(GCC)4	90	TCTGATCTCTTCGGTGTAGAGAAA // AAGAGATCTCCCAACCTAAGTGC	55,9//57,2
9-2	4,05	p-umc1303	(CCG)4	123	CTTGGTAGCTTCGTAATCGACGAG // ATCCTAGGAAAGCAGGGAGGG	57,2//56,1
9-3	2,06	p-umc1065	(ACA)7	151	ACAAGGCCATCATGAAGAGCAGTA // CACGGTCTGGCACACTAACCTTAT	55,5//57,2
9-4	5,03	p-umc1315	(CTG)6	90	CTTCAGTCCCCTACCTACCCTGAG // GAGTTGGGATGAGCAGCAAGATAG	60,6//57,2
10-1	3,04	p-umc1392	(AGC)4	91	CTAAGATAGCAGCGACAACCGACT // GCCTGCTCTAAAGACATTGCTCC	57,2//56,9
10-5	5,02	p-umc1761	(GCA)5	124	GGCTTGTAGTTGGAGTGGTCTGAG // AGCAGCTTCAGAGGAGGAAGAAG	58,9//56,9
12-3	5,02	p-umc2115	(TGCCA)5	156	CTGTCTGTCTACCAACCCAACAG // GGGGATAGCGTGTGTATGTACTG	62,8//62,4
12-8	5,03	p-umc1110	(AGC)7	126	TTACACCAAGGTCCGAAACAAGAT // TCTTGGAAAGGCAAGACTCTACCTG	53,8//57,2

ANEXO 1. Continuación.

Código CIAM	BIN	Código missouri	Repetición SSR	Tamaño amplicón (estimado)	Secuencia Primers (F/R)	TM (F/R)
12-10	8,08	<u>p-umc1069</u>	(GGAGA)6	95	AGAGAATCCCAAGCAAACAAC // CTTCATCGGAGCCATGGTGT	53,3//53,6
13-9	1,06	<u>p-umc1122</u>	(CGT)7	156	CACAACCTCCATCAGAGGACAGAGA // CTGCTACGACATACGCAAGGC	61,6
13-11	4,05	<u>p-umc1175</u>	(AAC)4	129	ACACCCAAAACCTCACTTAATCCA // CCCTCGTAGTCTGTCAAGGTTTTG	53,8//57,2
15-1	8,03	<u>p-umc1457</u>	(GTG)5	96	CCTAGGACACTGGAGGTTACAGA // GGCTAAGCGTTTTTACAAGTCCAA	58,9//53,8
15-2	1,11	<u>p-umc1744</u>	(GCGCCG)4	130	ATGAAGCTGGCTGATACGGAAT // CGAGCCCTTAATTAGTTCCTCGGT	52,8//55,5
15-4	2,06	<u>p-umc1755</u>	(CACGAG)4	97	CTCCTCGGCATCTACGAGATAC // GTGCTCGTGTCTCGTGGCTAT	58,7//55,7
15-7	6,07	<u>p-umc1621</u>	(CGC)4	97	AGACTCTGAGGAGGTAGACGCTGA // GACTCGGAGGCCTTCTACATGAT	58,9//56,9
16-9	7	<u>p-umc1241</u>	(GTCTTTG)4	159	TGAAGCAAGTCACTGGTAAGAGCA // TGACACCCCATACTTCCAACAAG	62,0
17-1	6,01	<u>p-umc1517</u>	(CGC)5	100	TAACACTCGGAACCTTCTTCTC // GATGGGAAAATGTGTGGAATTTAT	55,1//50,4
17-7	4,03	<u>p-umc2039</u>	(CAG)5		CATCTCCTACCAGCTCACCC // GCTCGGGTAGTAGTGTCTCCTT	58,1//58,9
18-3	6,01	<u>p-umc1444</u>	(ACA)4	160	ACTAGCACACCCCTTACCACTA // TGTGCTTGTGAGAAGGATTTGTTC	61,5
18-11	3,06	<u>p-umc1311</u>	(TCTT)4	136	CTCGACAACCTTTGGCTTCGTA // AAAGCGATGCCATCAGAATCTAAG	55,5//53,8
20-10	8,03	<u>p-umc1778</u>	(GTC)6	104	GTGAACCATGTAGCTGTCCCTG // GAGCTCGTACCTGTTTCATGAGGAT	56,9//57,2
20-12	6,08	<u>p-umc2324</u>	(CAC)4		GATCCTCTGTGCCAAACACTAAG // AGATGGTGACGATGAGTGATGAAC	62,1//61,1
2192	2,06	<u>p-umc2192</u>	(TGCG)4		CTGCTCTACTCCACACAGAGTCCA // CACTGACCAGAGTTTACCAAGCAA	66,8//66,2
1755	2,06/2,07	<u>p-umc1755</u>	(CACGAG)4	20	CTCCTCGGCATCTACGAGATAC // GTGCTCGTGTCTCGTGGCTAT	66,9//67,7
2281	4,03	<u>p-umc2281</u>	(GTCC)5	24	ATGATGATCTGCAGAGCCTAGTCC // CAATGATTGGAGCCTAACCCCT	66,6//66,9
1902	4,03	<u>p-umc1902</u>	(CT)16	27	CCTCATCTCTCATGGGATGGATA // TTCAGCATGACATATCATACAGTAGCA	66,0//65,3

F= Primer forward; R= Primer reverse; TM= T^a de melting.