

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD IRAPUATO
UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA

Aprovechamiento de la diversidad genética en las variedades
silvestres para el mejoramiento genético de las líneas élite: caso
parviglumis a bajos niveles de fósforo.

PRESENTA
ING. JORGE VLADIMIR TORRES RODRÍGUEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

DIRIGIDA POR:
DR. RUAIRIDH JAMES HAY SAWERS
DR. RUBÉN RELLÁN ÁLVAREZ

IRAPUATO, GUANAJUATO
2017

Agradecimientos	2
Dedicatoria	2
Resumen	3
Abstract	4
Introducción	5
El éxito de una planta está dado por su habilidad de competencia.	5
El Fósforo es un macronutriente esencial para los organismos vivos.	6
Descripción del sistema radicular en angiospermas	7
Diversidad silvestre como fuente de variación genética para modificar la plasticidad en cultivos “mejorados”	10
Precedente: Z031E0058 seleccionada como línea candidata para tolerancia a bajas condiciones de fósforo	14
Hipótesis	15
Metas	15
Objetivos	15
La línea Z031E0058 contiene múltiples regiones introgresadas de parviglumis, las cuales segregaron en una familia F2.	16
Crecimiento de las plantas F2	16
La morfología de la raíz en plantas cambia dependiendo de el grupo al que pertenecen	26
Mediante el uso de cruces Z031E0058 tiene genoma de parviglumis en un fondo genético B73	32
Regiones de parviglumis se encuentran segregando dentro de las plantas de la familia F2.	35
No existen diferencias fenotípicas ligadas a la región del cromosoma 1 en las plantas con más y menos biomasa.	38
Buscar si existe la región candidata en plantas con introgresiones de parviglumis más finas.	40
Conclusiones	41
Perspectivas	42
Materiales y métodos	43
Material vegetal	43
Condiciones de crecimiento	43
Preparación de alúmina	45
Preparación medio Hoagland	47
Mediciones de las plantas	48
Colecta de material	48
Llamado de SNPs	50
Bibliografía	53

Agradecimientos

Un agradecimiento:

Al Colegio Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico (CVU: 629712) otorgado a través de la beca. .

A los doctores, Ruairidh Sawers y Rubén Rellán Álvarez por permitirme aprender de ellos y la paciencia durante esta etapa de mi vida científica.

A las doctoras, Nayelli Marsch Martinez y Gertrud Lund por sus invaluable consejos.

Al laboratorio 9 y 10 del Langebio, en los cuales se encuentran amigos y compañeros que me ayudaron con cada experimento de la mejor manera.

A mis amigos, por sus consejos y por siempre estar ahí.

¡Gracias!

Dedicatoria

A mi familia, por enseñarme que se puede ser mejor día con día.

Resumen

Las plantas tienen diferentes rasgos intrínsecos, los cuales les permiten tener más éxito en ambientes fértiles y tienen otros rasgos que les permiten adaptarse en suelos con pocos nutrientes. En ambientes con pocos nutrientes, la adquisición de éstos, depende de características fisiológicas y morfológicas de la raíz. Aproximadamente el 70% de los cultivos se siembran en tierras con bajas concentraciones de fósforo alrededor del mundo. El fósforo (P) es un elemento que forma parte de muchas macromoléculas como los ácidos nucleicos, fosfolípidos y metabolitos intermediarios.

El maíz moderno (*Zea mays ssp. mays*) fue domesticado hace aproximadamente 9000 años de su ancestro, el teocinte (*Zea mays spp. parviglumis*) (Matsuoka, 2002). Este proceso de domesticación estuvo enfocado a seleccionar mejores rendimientos en condiciones óptimas de agua y nutrientes para el maíz, por lo que en cierto punto genes importantes para adaptarse a la carencia de nutrientes pudieron perderse.

El presente trabajo estuvo enfocado a estudiar si las introgresiones de *parviglumis* mejoran la capacidad de adaptarse a condiciones bajo fósforo (-P) de la línea pura B73. Para evaluar el efecto de las regiones de *parviglumis* dentro de Z031E0058 en -P se desarrolló una familia F2 utilizando como padres Z031E0058 x B73. La familia F2 fue evaluada en -P. Esta familia muestra una amplia variación en la biomasa producida en -P. En las plantas F2 se observó una correlación positiva entre la biomasa total producida y el tamaño del sistema radicular.

Para ver si las diferencias fenotípicas entre las plantas F2 están ligadas a introgresiones de *parviglumis*, se mapeó mediante RNA-Seq la línea Z031E0058. Se encontraron regiones de *parviglumis* en los cromosomas 1, 2, 3 y 7 de Z031E0058. Estas regiones se encuentran segregando dentro de la familia F2. Para identificar si la región segregante pertenece a *parviglumis* se probaron marcadores moleculares del tipo SSR (simple sequence repeat), sin embargo, la mayoría de estos no fueron útiles ya que no presentaron polimorfismo. Solo con el marcador SSR bnlg1331 fue posible identificar la región del cromosoma 1 que pertenece a *parviglumis* o B73. La región del cromosoma 1 no es la responsable de la variación fenotípica en -P en las plantas F2. Por lo tanto otras regiones de *parviglumis* pueden ser responsables del fenotipo en -P dentro de la familia F2.

Abstract

Plants have different intrinsic traits, which allow them to be more successful in fertile environments and other traits that allow them to adapt to soils with few nutrients. In environments with few nutrients, their acquisition depends on plants' physiological and morphological characteristics. Approximately 70% of crops around the world are planted on land with low phosphorus concentrations. Phosphorus (P) is an element that forms part of many macromolecules such as nucleic acids, phospholipids, and intermediary metabolites.

Modern maize (*Zea mays* ssp. *mays*) was domesticated approximately 9000 years ago from its ancestor, teocinte (*Zea mays* spp. *parviglumis*) (Matsuoka, 2002). This domestication process focused on selecting better yields in optimum conditions of water and nutrients for maize, so at some point genes important for adaptation to lack of nutrients could have been lost.

The aim of this study was to determine if *parviglumis* introgressions improves the capacity to adapt to low phosphorus conditions (-P) of the inbred line B73. To evaluate the effect of the *parviglumis* regions within Z031E0058 on -P, we generate F2 family using Z031E0058 x B73 as parents. The F2 family was evaluated in -P. This family shows wide variation in the biomass produced in -P. In F2 plants, a positive correlation between the total biomass produced and the size of the root system was observed.

To see if the phenotypic differences between F2 plants are linked to introgressed regions of *parviglumis*, line Z031E0058 was mapped by RNA-Seq. *parviglumis* regions were found on chromosomes 1, 2, 3, and 7 of Z031E0058. These regions are segregating within the F2 family. To identify if the segregating regions belong to *parviglumis*, molecular markers of the SSR (simple sequence repeat) type were tested, however, most of these were not useful due to lack of polymorphism. Only SSR marker bnlg1331 was capable of identifying if the region of chromosome 1 belonged to *parviglumis* or B73. This region of chromosome 1 is not responsible for the phenotypic variation in P in F2 plants. Therefore other regions of *parviglumis* may be responsible for the phenotype in -P within the F2 family.

Introducción

El éxito de una planta está dado por su habilidad de competencia.

Las plantas se encuentran en una competencia por recursos que les permitan crecer de manera adecuada. Los recursos pueden dividirse dependiendo de por dónde los adquiere la planta, ya sea por la parte aérea, como la luz, o subterránea por agua o nutrientes comúnmente. Las plantas utilizan la parte aérea o las raíces para competir por estos recursos. Lo que significa que las plantas tienen que implementar estrategias y balances en la biomasa de estas partes para tener más éxito al competir por determinados recursos (Aerts, R. et al. 1991)

Existen diferentes rasgos en las plantas que dan mejor adecuación en ambientes con nutrientes pobres y los rasgos que dan más éxito en ambientes más fértiles. En suelos fértiles la mayor competencia es por luz mientras que en suelos pobres, como la mayoría de los ambientes silvestres, puede existir competencia por nutrientes y luz.

La mayoría de los estudios sobre toma de nutrientes en plantas de interés agrícola mencionan la alta cinética de consumo como la característica principal para tomar más nutrientes. Sin embargo esta característica no es deseable en zonas con bajas concentraciones de nutrientes. Esto implica que el factor limitante en los ambientes silvestres no es la cinética de consumo, si no la tasa de difusión de los iones en el suelo. Por lo tanto las estrategias que utilizan las plantas silvestres son otras.

La adquisición de nutrientes, en ambientes carentes de éstos depende de características fisiológicas y morfológicas, y del tipo de hábitat. Los rasgos morfológicos y fisiológicos relacionados con la toma de nutrientes pueden ser desde a nivel organo (proporción raíz/parte aérea) hasta rasgos al nivel celular como la densidad y el momento en el que son producidas las raíces (Casper, B. B., & Jackson, R. B. 2017) , estos rasgos son especialmente importantes con la toma de nutrientes de baja difusión. (Aerts, r. 1999).

El Fósforo es un macronutriente esencial para los organismos vivos.

El Fósforo (P) forma parte de muchas macromoléculas como los ácidos nucleicos, fosfolípidos y metabolitos como los intermediarios fosforilados además de participar en procesos como la fotosíntesis. La baja disponibilidad de P es una de las principales limitantes en la agricultura alrededor del mundo debido entre otras causas a la baja disponibilidad en el suelo por la formación de óxidos insolubles de hierro y aluminio (Lynch, J. P. 2011) y su largo ciclo bioquímico (Rose T. J. et al., 2013).

Para lidiar con estas limitantes las plantas no micorrizadas cuentan con dos estrategias principales para tomar P del suelo: el incremento de la superficie de exploración del suelo mediante su modificación del sistema radicular y la movilización de fosfato de

zonas cercanas a la rizosfera a través de exudados. Por lo tanto la capacidad de las plantas para tomar fósforo está directamente relacionado a la capacidad de explorar el suelo. Mientras que en las plantas que forman simbiosis con micorrizas arbusculares además de modificar sus sistemas radiculares en - P, el hongo puede explorar el suelo mediante sus hifas y proveer a la planta con el Pi para crecer (Bucher, M., & Bucher, M. 2007) lo que es benéfico para la planta, dado que puede explorar mas el suelo sin invertir demasiados recursos en su sistema radicular.

Aproximadamente el 70% de los cultivos se siembran en tierras con bajas concentraciones de P por lo que surge la necesidad de aplicar este como fertilizante, ocasionando que sus reservas mundiales se agoten de forma acelerada. (Lynch, J. P., 2011; Herrera-estrella, L. 2016)

Descripción del sistema radicular en angiospermas

El sistema radicular de las angiospermas puede dividirse en dos tipos a) “raíz principal” o “taproot”, en cual pertenece a plantas eudicotas y b) “fibrosos” en monocotiledoneas (Rellán-Álvarez, R. et al. 2016). El ejemplo más estudiado de un “taproot” puede ser arabis en cual consta de una raíz principal de la cual brota una red de raíces laterales las cuales permanecen activas durante la vida de la planta. (Osmont, K. S et al. 2007). Dentro del sistema radicular fibroso se encuentran algunos pastos y cultivos de interes agronomico como el maíz. El sistema radicular del maíz está conformado por

raíces embrionarias, las cuales emergen de la semilla, entre las que podemos encontrar la raíz primaria y las raíces seminales, y por raíces post-embrionarias ó adventicias (Steffens, B & Rasmussen, A. 2016.) (originadas en el tallo) como las raíces de la corona que se encuentran debajo de la tierra y las raíces de “refuerzo” que crecen sobre el suelo (figura 1) (Hochholdinger et al. 2004). Las raíces embrionarias sirven para un adecuado establecimiento de la plántula mientras que las raíces post-embrionarias ayudan al rendimiento final del grano (Hochholdinger, F & Tuberosa R. 2009).

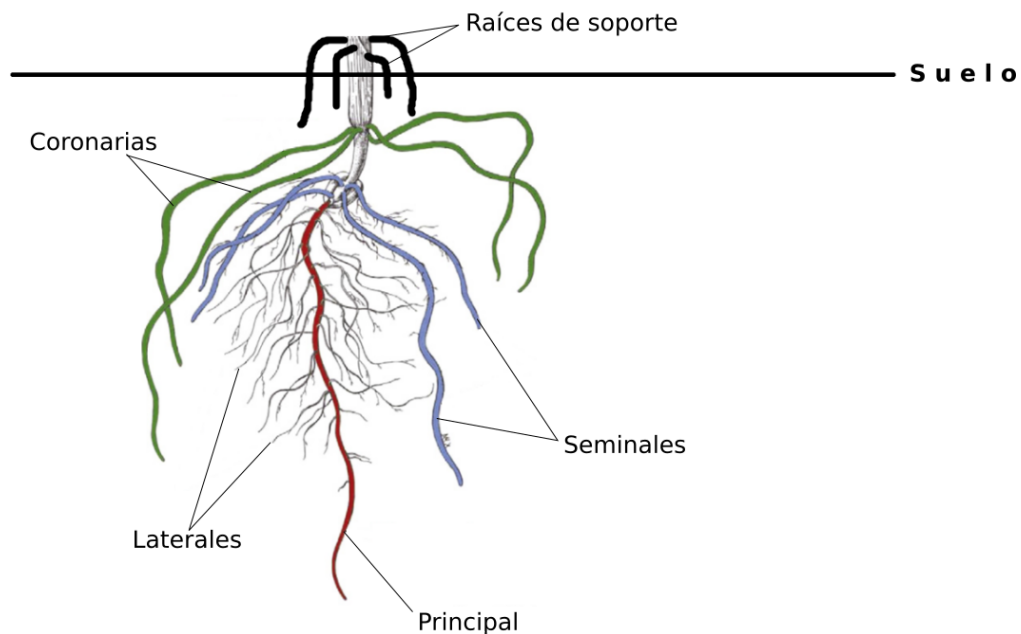


Figura 1. Disección del sistema radicular de la raíz de maíz. Las raíces embrionarias (la raíz principal y seminal, representado por la línea roja y azul, respectivamente) y post embrionarias (las raíces coronarias y de soporte, representado por la línea verde y negra, respectivamente). Modificada de Hochholdinger, F., & Tuberosa, R. 2009.

Dependiendo de su tipo de sistema radicular las plantas muestran estrategias características para obtener una respuesta hacia factores ambientales (Rellán-Álvarez, R. et al. 2016). Estos cambios dependen del tipo de estrés al que sea sometida la planta y su habilidad para competir por recursos. Por ejemplo en la carencia de fósforo, a pesar de que los dos tipos de raíces buscan desarrollar sistemas radiculares más superficiales los cuales son mejores para tomar el nutriente inmóvil del suelo, los mecanismos por los que intenta modificar su habilidad para tomar P cambian. En *arabidopsis* en -P, el crecimiento de su raíz principal se detiene, forman más raíces laterales y mas pelos radiculares (Sánchez-calderón, L. et al. 2005). En maíz, además de incrementar el número y longitud de raíces post embrionarias (Rose T. J. et al., 2013), el crecimiento de su raíz principal no se ve afectado en -P (Péret, et al. 2014).

El sistema radicular no sólo modifica su arquitectura como una respuesta a la carencia de nutrientes en el medio, también se ha visto que produce una mayor cantidad de transportadores de alta afinidad para mejorar la capacidad de obtener nutrientes.

Diversidad silvestre como fuente de variación genética para modificar la plasticidad en cultivos “mejorados”

El maíz es el cultivo de más importancia para México, es la principal fuente de proteínas y carbohidratos para muchos grupos étnicos y una buena fuente para la población en general. México es el centro de origen y posiblemente en lugar donde exista mayor diversidad de estos (Ruiz-Corral J. A. et al., 2008).

Hace aproximadamente 9000 años el maíz (*Zea mays ssp. mays*) fue domesticado de su ancestro el teocinte (*Zea mays spp. parviglumis*) en la región del Balsas en el sureste mexicano (Matsuoka, 2002). Dicho proceso de domesticación modificó la morfología (Doebley, J. 2004) y el estilo de vida del maíz moderno comparado con *parviglumis* (Schmidt, J. E. et al. 2016). Mediante análisis de genética de poblaciones se reveló (Wright, S. I., et al. 2005) que alrededor de 2-4% de los genes de maíz fueron blancos de selección artificial durante el proceso de domesticación o mejoramiento, es decir alrededor de 1000 genes, mientras que Hufford et al (2012) encontraron 1764 genes con un método probabilístico. Esto no necesariamente indica que estos genes son los mejores para sistemas de agricultura actuales; inclusive es probable que se hayan fijado algunos alelos subóptimos (Tenailon, M. I. et al. 2002).

Tomando en cuenta esta diversidad genética que se mantiene en los parientes silvestres de los cultivos ahora “élite” se pueden buscar regiones de su genoma (QTLs)

que puedan re-introducirse a estos cultivos para mejorar su respuesta a condiciones de estrés. Existen ejemplos en arroz para deficiencia de fósforo (Gamuyao, R. et al, 2012), inundación (Fukao, T, et al 2006) y sequía (Uga, Y et al, 2013); en trigo para tolerancia a suelos salinos (Munns, R. et al, 2012); en sorgo (Lana, U. G. P. et al, 2007) y maíz (Maron, L. G. et al 2013) contra la toxicidad causada por aluminio. Cada respuesta a estos tipos de estrés tiene respuestas específicas para resolver el problema la cual puede involucrar modificar su arquitectura de raíz, producir más transportadores, dormancia, reducir transpiración, entre otros.

Para estudiar la diversidad genética presente en sub-especies silvestres, hacer una comparación directa entre maíz, teocinte y las razas para cualquier característica es poco factible ya que estos últimos tienen muchos rasgos agronómicamente indeseables. Se pueden desarrollar poblaciones de mapeo (PM) para estudiar dicha diversidad. Estas poblaciones constan de una serie de individuos generados a través de auto-polinizaciones. Dichas PM pueden tener la mitad de genoma de una variedad a estudiar dentro de una "conocida" (RILs : Recombinant Inbred Lines) o tener pequeños fragmentos (~ 6% del genoma) en un fondo genético conocido (Figura 3) (NILs : Near - Isogenic Lines). Ambas PM buscan, mediante el apoyo de marcadores moleculares (Collard, B. C. Y. 2005), que a su vez se apoyan del principio de la recombinación durante la reproducción sexual (meiosis), identificar una región cromosómica la cual modifique el comportamiento de una característica cuantitativa (QTLs : Quantitative trait

Loci) como el tamaño o número de grano dentro de una mazorca de maíz o los días a floración dentro de una variedad.

Dentro de estas poblaciones de mapeo existen ventajas y desventajas las cuales el investigador debe de conocer bien para decidir cual es más conveniente utilizar. Si los fenotipos no son muy contrastantes, se pueden utilizar Recombinat inbred Lines (RILs); mientras que, si el fenotipo es muy contrastante, por ejemplo un teocinte con maíz moderno se pueden utilizar Near Isogenic Lines (NILs), las cuales permitirán estudiar esta diversidad presente en las variedades ancestrales sin penalizar la producción de las variedades modernas. (Figura 2. Photographs by Sherry Flint-Garcia in Sood, S et al. 2014).

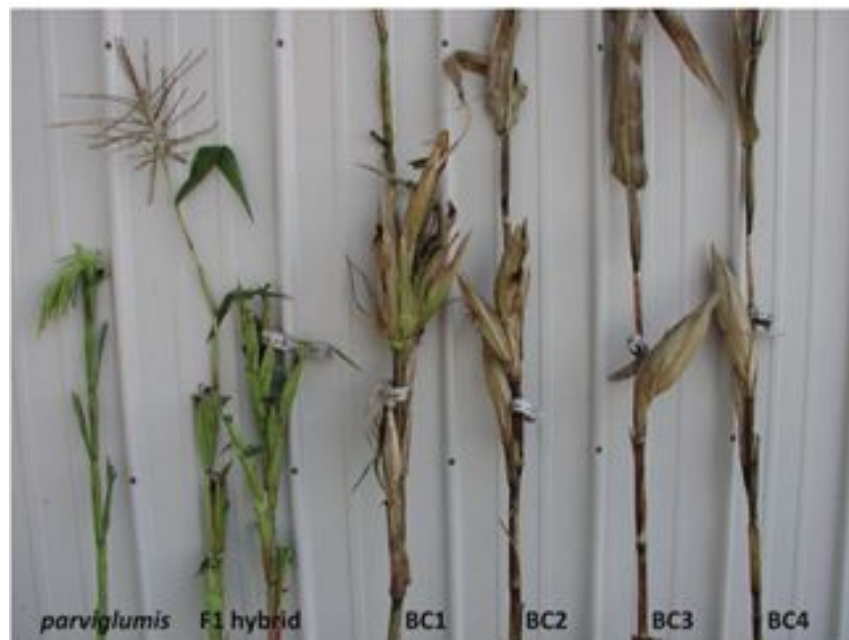
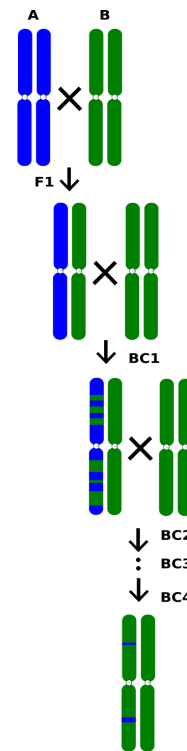


Figura 2. Conforme se va perdiendo material genético de *Zea mays ssp. parviglumis* dentro de un fondo genético *Zea mays ssp. mays* (B73) la planta se parece más a B73. La

figura muestra el fenotipo de parviglumis en el extremo izquierdo mientras que en el derecho una retrocruza 4 (BC4) con aproximadamente 6% del genoma del maíz.

Tomando en consideración las características morfo y fisiológicas del teocinte, las cuales no todas son deseables dentro de un maíz moderno, quizás sea preferible estudiar su diversidad genética mediante líneas de introgresión realizar líneas casi isogénicas (NILs) , las cuales se generan mediante cruzas, primero entre los parentales para obtener una F1 con un 50% del material genético de ambos padres, posteriormente se hace una retrocruza para quedarnos con el 25 % del material genético del padre y el 75 % de la mama; De esta manera se pueden ir retrocruzando los hijos que se vayan generando hasta obtener una familia línea con alrededor del 6% del genoma a estudiar (Figura 3)

Figura 3. Desarrollo de una línea casi isogénica. “A” es un genotipo del cual se quiere estudiar alguna región al azar o de manera *per se* y “B” es un genotipo de referencia. En este caso A es *parviglumis* (azul) y B es B73 (verde), se realiza una cruce entre estos genotipos para obtener una F1 y esta se va retro-cruzando con B73 tantas veces como sea conveniente para el estudio.



Precedente: Z031E0058 seleccionada como línea candidata para tolerancia a bajas condiciones de fósforo

La línea pura B73 (Schnable, P. S et al. 2009) y una colección completa de líneas casi isogénicas (NILs) con diversas introgresiones de *parviglumis* fueron crecidas en tubos de PVC durante seis semanas en alúmina-arena como sustrato. Las plantas fueron regadas con una solución Hoagland a diferentes concentraciones de P.

Se seleccionó la línea llamada Z031E0058 la cual parecía tener una mayor producción de biomasa en la parte aérea en bajos niveles de P (figura 4), la cual ha sido genotipada mediante SNP-chip por Flint-García (Datos no publicados).

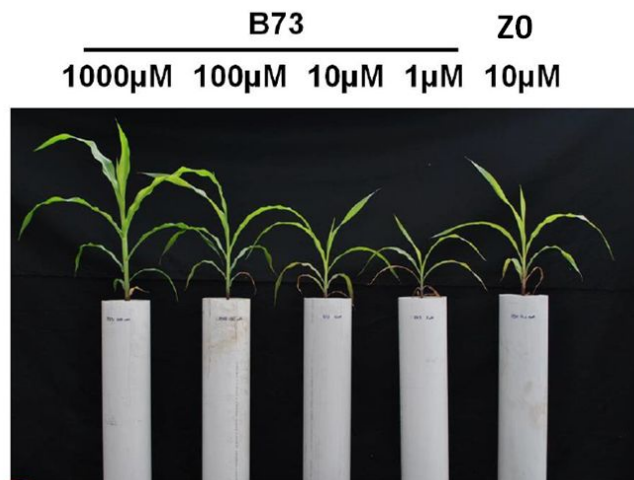


Figura 4. B73 y Z031E0058 (Z0) creciendo en tubos de PVC con alúmina y arena en diferentes concentraciones de fósforo. Z0 muestra un crecimiento superior a B73 en 10 uM a 6 semanas de germinadas. (Sawers, R. J. H et al. Datos no publicados)

Hipótesis

- La mayor producción de biomasa en Z031E0058 es debida a una región dentro de su genoma perteneciente a *parviglumis*, lo que le permite ser más eficiente en suelos con bajo nivel de fósforo.

Metas

- Mapear las regiones del genoma de Z031E0058 pertenecientes a *parviglumis*.
- Analizar fenotípicamente y genéticamente la familia F2 segregando las regiones de *parviglumis* de Z031E0058 para comprobar la ligación genética con la habilidad de crecer en condiciones de carencia de fósforo.

Objetivos

- Utilizar datos de RNA-Seq obtenidos de un experimento previo para descubrir SNPs a lo largo del genoma de Z031E0058.
- Cruzar B73 x Z031E0058 para generar una población F1 y posteriormente autopolinizar para generar una familia F2.
- Crecer y evaluar las plantas F2 en un sistema de invernadero en bajas condiciones de fósforo.

La línea Z031E0058 contiene múltiples regiones introgresadas de *parviglumis*, las cuales segregaron en una familia F2.

Para confirmar la idea que Z031E0058 produce mayor biomasa en condiciones de carencia de fósforo y conocer de qué manera están interactuando las regiones de *parviglumis* dentro de Z031E0058 para brindar esta respuesta, se generó una familia segregante F2, cruzando B73 x Z031E0058 para generar una población F1 y posteriormente autopolinizando para generar una familia F2.

Crecimiento de las plantas F2

Para evaluar crecimiento y desarrollo en carencia de fósforo (-P), se crecieron 104 plantas F2 en invernadero dentro de tubos de PVC en arena con alumina. Se utilizó B73 en altas condiciones de P como un control técnico para verificar si nuestras plantas estuvieron creciendo en -P. El experimento, estuvo dividido en 4 grupos dependiendo de su día de siembra, A, B, C y D, existiendo dos días de diferencia dentro de cada grupo, es decir entre el grupo A - B existieron dos días mientras que para el grupo A - D existieron 8 días de diferencia.

En un experimento existen condiciones ambientales que pueden afectar el fenotipo final de la planta. Nosotros solo estamos interesados en la respuesta de la familia F2 a -P. Para ver si existen factores además del P que están modificando la cantidad de

biomasa producida por las plantas se analizó la distribución espacial dentro de experimento de estas con relación a su peso fresco total. Graficando los pesos frescos de manera individual se puede observar si las plantas con más biomasa producida tienden a agruparse en una determinada área del experimento. Si esto ocurre así es probable que existan factores ambientales que estén afectando el resultado final del experimento.

Para evaluar si existen factores ambientales que están actuando sobre la biomasa fresca total producida por las plantas F2, se tomaron las distancias entre los tubos dentro del experimento. Partiendo de un tubo inicial (0,0) se puede relacionar la posición física relativa (coordenadas x, y) de los otros tubos.

En la figura 5 se muestra el peso fresco total de cada planta con respecto a sus respectivas coordenadas. Se observó una tendencia de las plantas a producir mayor biomasa dependiendo de su posición física relativa en el experimento. Por ejemplo, el grupo D, parece tener una mayor cantidad de plantas con mayor biomasa con respecto a los demás grupos.

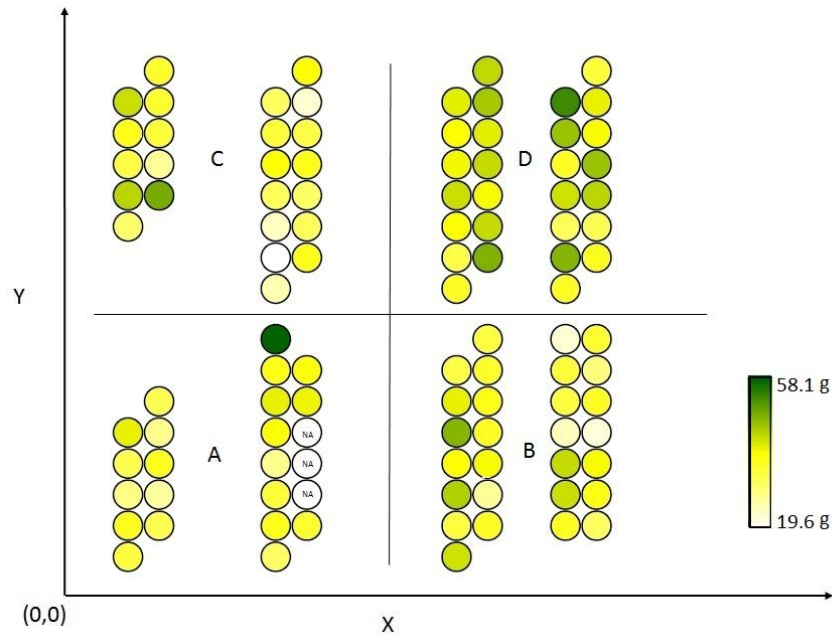


Figura 5. Posiciones físicas de los tubos en los cuales crecieron la familia segregante F2 según sus coordenadas x,y. Las coordenadas permiten ubicar a las plantas en sus posiciones relativas dentro del área experimental, el experimento está dividido en cuatro grupos (A, B, C y D) dependiendo del día de siembra. Los colores muestran la cantidad de biomasa para las plantas dentro de cada tubo a los 36 días de emergidas. Los colores más verdes es mayor peso que los amarillos y blancos.

Para estar seguro de escoger los fenotipos que responden mejor a la carencia de fósforo es necesario aplicar modelos estadísticos en los que podamos controlar los errores. Para ello se utilizó el modelo lineal mixto (eq 2) el cual permite relacionar una variable dependiente con variables independientes fijas y aleatorias.

$$y = X + Z + \varepsilon$$

y = variable dependiente

X = Efectos fijos del experimento

Z = Efectos aleatorios del experimento

ε = Error

Eq. 2. Fórmula general del modelo lineal mixto.

Con ayuda del paquete de R “lmer” (Douglas, A. et al. 2016) se buscó eliminar la mayoría de estos efectos aleatorios. El modelo propuesto fue utilizar el peso fresco total como la variable dependiente y utilizar como variable aleatoria el grupo de siembra en el cual se situaban las plantas (eq 3). De este modo, se obtuvieron los residuales que son todos aquellos puntos que no ajustan al modelo utilizado, utilizando estos como un estimado de la biomasa sin los efectos del grupo. (Figura 9)

$$lmer(\text{Peso Fresco Total} \sim (1|\text{grupo}))$$

Eq. 3. Modelo lineal mixto utilizado con el paquete de R “lmer”. En la fórmula especifica el peso fresco total depende de la variable aleatoria grupo.

Para comparar el crecimiento de de las plantas segregantes, se graficaron los residuales obtenidos. La familia F2 mostró una amplia variación en la cantidad de biomasa producida (figura 6). Existen plantas que se sitúan muy por debajo de la media (línea roja) y plantas que producen más biomasa que el resto, incluso son muy similares a las plantas B73 en +P (figura 7, línea azul). Se consideraron las cinco plantas que produjeron más y menos biomasa para analizar más a detalle sus fenotipos aéreos y subterráneos para dilucidar cómo es su proceso de adaptación a -P.

Las plantas con más biomasa mostraron una reducción del 16% en condiciones de carencia de P con relación a la biomasa total producida por las plantas B73 en +P, mientras que las plantas con menos biomasa redujeron en 60%. Si se considera la diferencia en la concentración de P aplicado en la fertilización (33 veces menos en las plantas con -P que en las +P), podemos apoyar la idea que ciertas regiones del material genético silvestre dentro la familia F2 está contribuyendo a una mejor adaptación a suelos con -P posiblemente mediante la modificación de su sistema radicular.

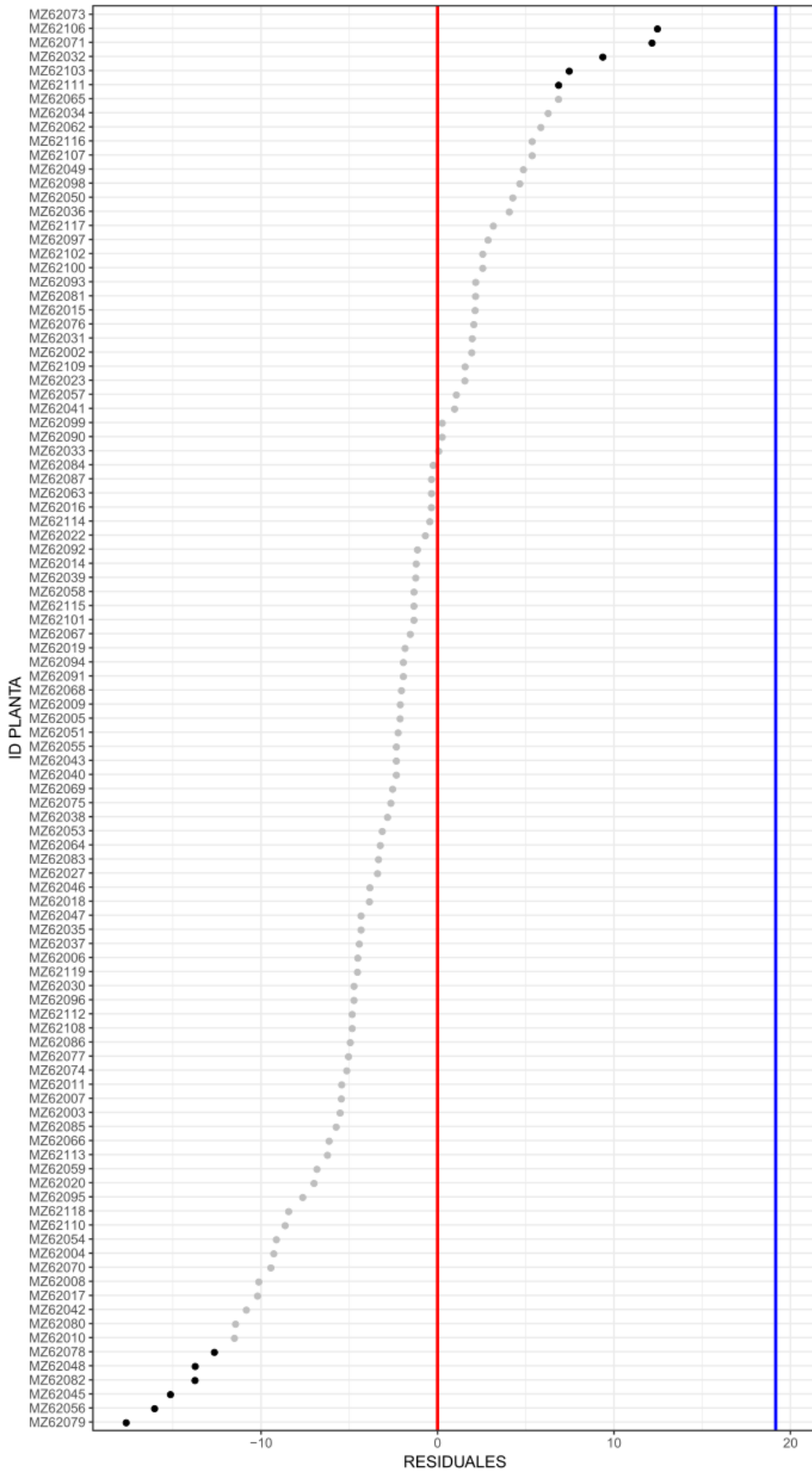


Figura 6. Residuales obtenidos del modelo lmer (Peso Fresco Total ~ (1|grupo)). Los puntos de color gris son todas las plantas F2 que tienen un comportamiento medio, los puntos en color negro en la parte superior e inferior de la gráfica son las plantas que fueron seleccionadas para estudiar su comportamiento en bajo fósforo (10 μM), la línea azul es la media de B73 (n = 12) en alta concentración de fósforo (333 μM).

Las plantas F2 tienen diferentes estrategias para responder a suelos con bajas condiciones de fósforo.

Basados en la biomasa total producida por las plantas de la familia F2 se puede ver que existen plantas más grandes que otras. Para ver si existe diferencia en la manera en la que estas plantas distribuyen sus recursos entre la parte aérea y subterránea, se realizó un ratio del peso raíz entre el peso de la parte aérea. En las plantas con más biomasa, existe una mayor cantidad de recursos destinados a la exploración del suelo (aproximadamente el 40 % más biomasa a la raíz que a la parte aérea). Las plantas con menos biomasa destinan la misma cantidad de recursos a la raíz y su parte aérea (Fig. 7). Esta habilidad de las plantas de ciertas plantas dentro de la familia F2 para destinar más recursos a la exploración del suelo en -P, puede ser una ventaja para tomar más P. Schwinning, S., & Weiner, J. (1998) declaran que, parte de la habilidad para crecer en condiciones de carencia radica en que las plantas incrementan la alocaación de recursos en el órgano que les permita capturar más el elemento limitante y en lo posible incrementar la eficiencia con la que se utilizan los recursos. Se ha visto que en plantas evergreens *Erica tetralix* y *Calluna vulgaris* y la perenne *Molina caerulea*

destinan más biomasa a la raíz en suelos con bajos nutrientes (Aerts et al. 1991). Esta respuesta fenotípica es común para todas las especies (Aerts, 1999).

Por las condiciones en las que ha sido desarrollada la línea pura B73 (concentraciones adecuadas de nutrientes y agua) posiblemente ha perdido la capacidad de responder a la carencia de nutrientes. Es posible que cuando el agricultor note la carencia de nutrientes en las plantas, los aplica. Ocasionando que estén disponibles muy cerca del sistema radicular del maíz, por lo tanto las plantas perdieron su habilidad de destinar más recursos al sistema radicular para buscar nutrientes inmóviles como el -P.

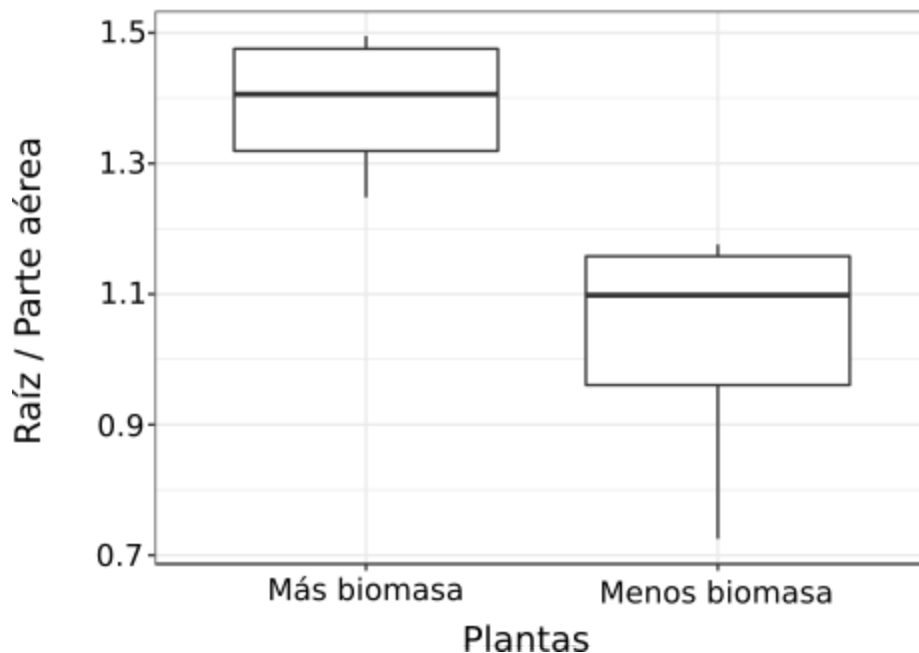


Figura 7. Más recursos a la exploración del suelo en -P en las plantas con más biomasa en relación con las plantas con menos biomasa. (Wilcoxon rank sum test, p-value = 0.008). Proporción obtenida de la raíz / parte aérea a los 36 días de germinadas las plantas F2 en bajas condiciones de fósforo (n = 5)

Una de las estrategias por las cuales las plantas destinan mayores recursos al crecimiento de la raíz en bajas condiciones de nutrientes es mediante la reducción del crecimiento en las partes aéreas. Esta estrategia se mantiene uniforme tanto en maíces modernos como el razas (Gaudin, A. C. M. et al. 2011), sin embargo, los mecanismos mediante los cuales alcanzan estas respuesta son un poco diferentes.

Para analizar cómo se ve reducida el área foliar con respecto al tamaño de la raíz, se tomaron mediciones del área foliar de las plantas desde el día 5 después de emergidas hasta el día antes de su cosecha.

En la figura 8 se observa el ritmo de crecimiento del área foliar de las plantas con más y menos biomasa. Los tratamientos comenzaron el día 10 de emergidas las plantas. Las plantas con más biomasa muestran una superficie foliar mayor (P value = 0.05) al compararlas con las plantas con menos biomasa, incluso antes de aplicar el tratamiento (día 10). Estas diferencias pueden ser debidas a algo intrínseco, posiblemente al material genético que tiene las semillas.

A medida que las plantas se desarrollan, comienza a hacerse más marcada la diferencia y a tomar más importancia la concentración de P en el suelo. Posiblemente, el fósforo sea mejor aprovechado por algunas plantas lo cual puede traducirse en mayor producción de biomasa. Ésta puede destinar más carbohidratos a la producción de área foliar lo cual contribuye a la formación de los mismos y permite, mediante el crecimiento de la raíz, explorar más el suelo en busca de nutrientes.

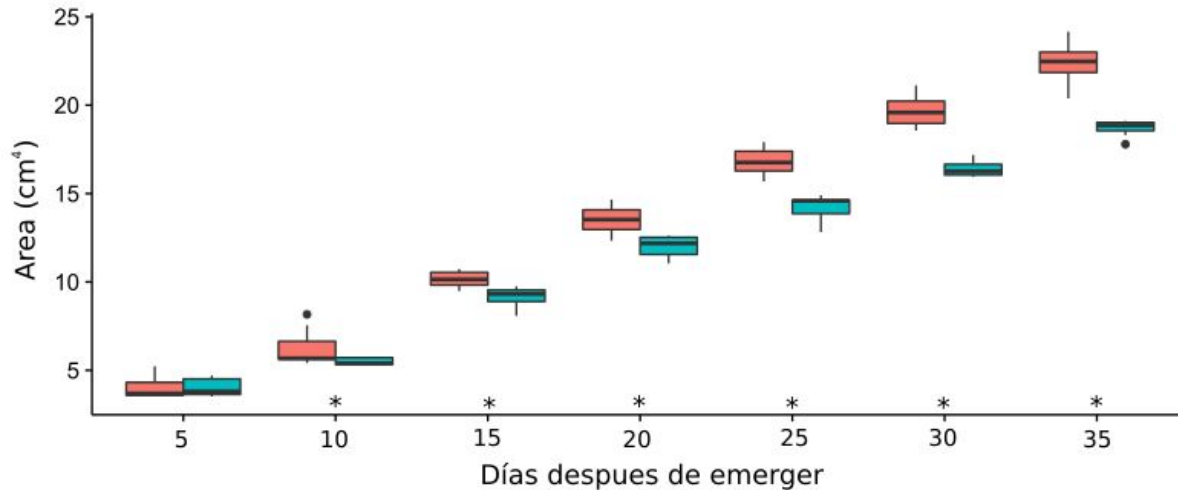


Figura 8. Área foliar al cuadrado de las plantas con más (rojo) y menos biomasa (azul) cada 5 días un día antes de su cosecha. Los asteriscos en la parte inferior muestran el análisis estadístico (P value = 0.05). La diferencia en el área foliar comienza desde antes de aplicado el tratamiento (día 10) y va siendo más marcada con el paso del tiempo. ($n = 5/\text{día}$ de toma de la muestra).

En las plantas, la habilidad para modificar la morfología o la fisiología en respuesta al ambiente, es asumida que tiene bases genéticas y por lo tanto ha sido sujeta a selección natural (Reynolds, H. L., & Antonio, C. D. 1996).

Se ha visto que un mecanismo por el cual *parviglumis* reduce su área foliar en bajas condiciones de nutrientes es disminuir su área foliar mediante la pérdida de vástagos, para disminuir el número de hojas. Por otro lado W22, una línea desarrollada en condiciones favorables de recursos, reduce su área foliar mediante la reducción en el tamaño de sus hojas. Este tipo de estrategias se ve en plantas que no tienen vástagos como el maíz y el girasol, y en plantas con vástagos como la papa (Gaudin, A. C. M. et al. 2011).

Dadas las ideas anteriores, surge la pregunta de cómo este mecanismo ancestral está afectando las plantas, las cuales recordar tiene algunas regiones de *parviglumis* en un fondo genético de maíz moderno.

Esta estrategia para disminuir el área foliar presente en *parviglumis* puede presentar una ventaja para desarrollar mejor un sistema radicular en bajas condiciones de fósforo.

La morfología de la raíz en plantas cambia dependiendo de el grupo al que pertenecen

Retomando la idea donde, destinar más recursos a la exploración del suelo puede tomar más recursos en bajas concentraciones de nutrientes, y utilizar estos recursos para crecer más, puede verse reflejada en la figura 9a. La figura 9a muestra los sistemas radiculares de las plantas con más biomasa. Las plantas con más biomasa tienden a mostrar un sistema radicular más grande con relación a las plantas más pequeñas en -P. Sin embargo, la habilidad de competir por nutrientes no depende únicamente de la biomasa destinada a la raíz, sino también de las características morfológicas (Aerst, R. 1999).

Para ver si las plantas además de ser más grandes invierten su biomasa en determinados segmentos de la raíz para modificar su arquitectura, se dividieron en

segmentos y se pesaron de manera individual. Se ha graficado el porcentaje acumulado de raíces en relación al porcentaje de profundidad (largo) (figura 9b). Las plantas muestran una distribución de su biomasa a lo largo de la raíz muy similar. Por lo tanto no existe un cambio en la forma relativa del sistema radicular. Las raíces secundarias ayudan a las plantas a tomar una mayor cantidad de nutrientes, entre ellos el P (Lynch, J. P, 2013).

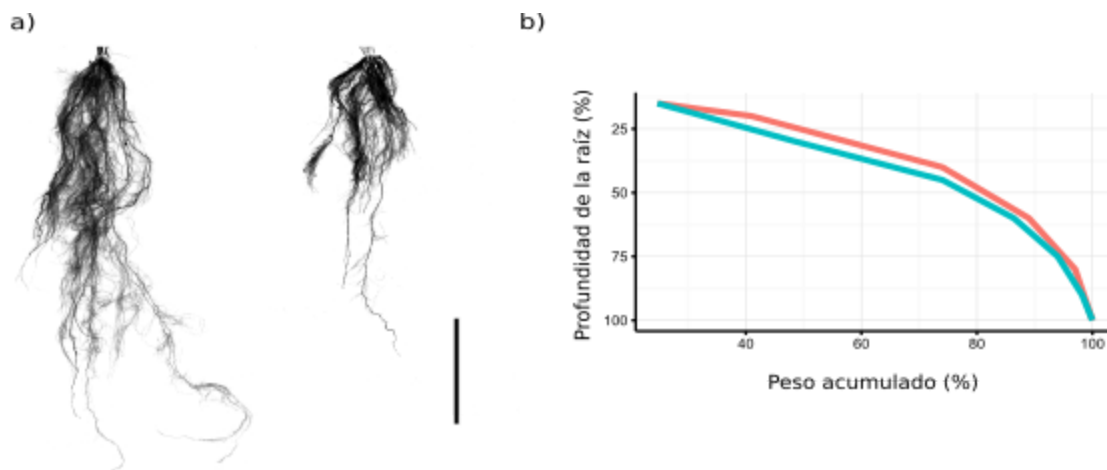


Figura 9. Los sistemas radiculares de las plantas F2 con más biomasa son más grandes en -P, sin embargo su forma relativa no cambia con respecto a las plantas con menos biomasa. a) Topología de los sistemas radiculares a 36 días después de emerger. Plantas F2 con más biomasa (izquierda) tienen sistemas radiculares más grandes que las plantas con menos biomasa (derecha). La barra indica 20 cm. b) Porcentaje relativo del peso acumulado de la raíz a lo largo de la misma en las plantas F2 a 36 días después de emerger. La línea azul muestra la distribución de las plantas con más biomasa y la roja las plantas con menos biomasa (n = 10).

Se ha visto que las plantas en carencia de fósforo buscan producir más raíces en la las partes superficiales donde se encuentra el fósforo.

Para probar si esta es una característica presente en las plantas con más biomasa. Se evaluó el peso fresco total dentro de los primeros 30 cm (Figura 10). Estos 30 cm representan la zona de fósforo en el experimento. Las plantas F2 con más biomasa tienen un mayor peso fresco que las plantas con menos, en la zona donde se encuentra el fósforo, lo que representa mayor cantidad de raíces donde existe el elemento limitante y puede traducirse en una ventaja competitiva.

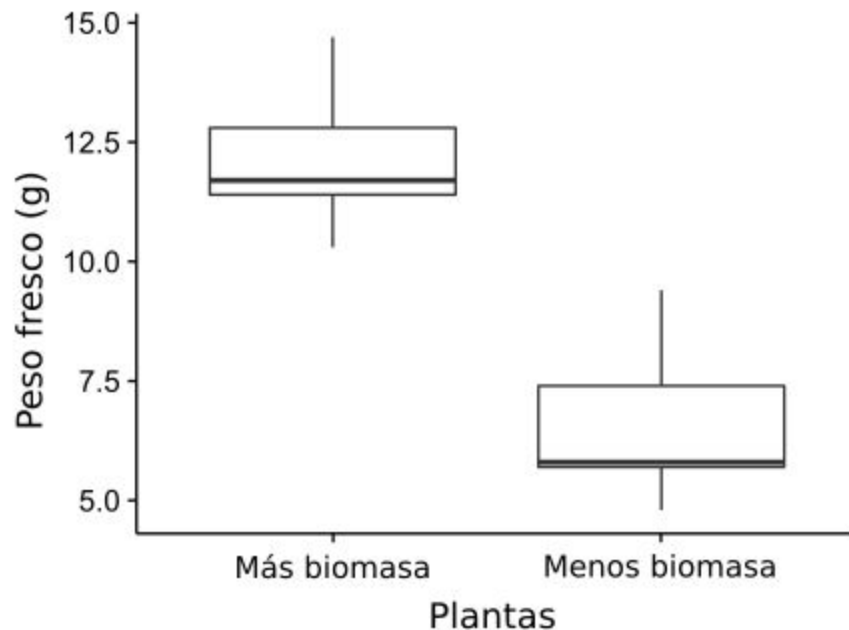


Figura 10 . Biomasa en los primeros 30 cm de las plantas con más y menos biomasa dentro de la familia F2. Peso fresco de la raíz dentro de los primeros 30 cm de profundidad a 36 días después de emerger. Las plantas con más biomasa muestran mayor peso (Wilcoxon rank sum test, p-value = 0.05). Lo que puede significar mayor densidad de raíces laterales en esta zona (n = 10)

Además de analizar la morfología de la raíz en estos grupos de plantas también analizamos el número de raíces producidas. Las raíces coronarias (CR) representan el

mayor porcentaje del sistema radicular del maíz. Por lo tanto una buena parte de los recursos de las plantas que se destinan hacia los sistemas radiculares pueden estar formando CR. Dentro de la familia segregante se observa un mayor número de raíces de la corona en las plantas con más biomasa (media 16) con respecto a las plantas más pequeñas (media 13) (figura 11), sin embargo esta tendencia no es significativa, quizás por el tamaño de muestra.

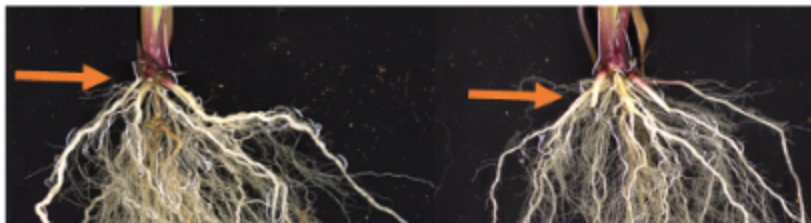
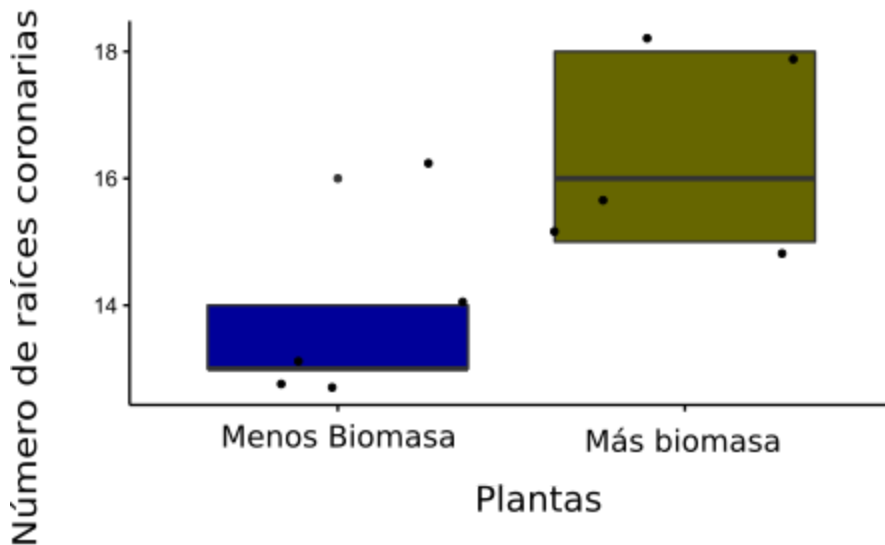


Figura 11. Mayor número de raíces de la corona (CR) en plantas F2 con más biomasa a 36 días después de emerger en -P. En la parte superior se muestran plantas con menos (izquierda) y más biomasa (derecha). Las plantas con más biomasa tienden a desarrollar un mayor número de CR, sin embargo esta tendencia no es significativa, posiblemente por el tamaño de muestra. En la parte inferior se muestra una foto al momento de ser cosechadas las plantas, mostrando la zona en que son producidas las CR con una flecha roja. (n =10)

Al no existir diferencia estadísticamente significativa en el número de CR producidas, quizás los recursos puedan tener otro destino. Se puede observar en la gráfica 9a que el sistema radicular de las plantas con más biomasa es más largo con respecto a las plantas con menos biomasa. Esta profundidad real alcanzada en las plantas más grandes(105 cm) puede ser debido a estas CR (Figura 9a). Se ha demostrado en algunos estudios realizados con *parviglumis* y W22 (línea inbred) (Gaudin, A. C. M. et al. 2011) en diferentes concentraciones de nitrógeno, existe una mayor capacidad para incrementar la longitud de las CR en - N en *parviglumis* casi 2 veces más en relación con su medida en + N, mientras que W22 lo hace solo 30 % más. Es decir, dentro del genoma de *parviglumis* existe la capacidad de elongar sus raíces en busca de N. Lo observado en nuestro experimento con en relación al P sugiere que esta característica puede estar presentando para ambos casos.

Nuestras observaciones tienen relación con lo reportado en fenotipos que mejor se adaptan a suelos con bajos niveles de P (Steffens, B & Rasmussen, A. 2016; López-Arredondo, D. L. et al. 2014), en donde un mayor número de CR confiere una mayor tolerancia, este tipo de raíz post-embriónica subterránea que emerge del tallo subterráneo pueden incrementar la toma de fósforo. Éste tipo de raíz tiene un ángulo de crecimiento más superficial, aunque por el diseño del experimento esto no puede apreciarse adecuadamente, además que que son metabólicamente más económicas

que otro tipo de raíces, lo que les permite explorar el suelo a un menor costo (Lynch J. P., 2011).

Por el diseño experimental nos es difícil decir el momento en que fueron producidas el mayor número de CR en la plantas a lo largo de sus 36 días de desarrollo, para poder ver si existe una diferencia con respecto a su habilidad para competir por la toma de nutrientes en función del tiempo en el que son producidas las raíces (Casper, B. B., & Jackson, R. B. 2017). Para responder la pregunta esta pregunta, primero debemos conocer la región que regula la respuesta de las plantas F2 con más biomasa en -P y después hacer experimentos en lapsos de tiempo para saber como es el desarrollo de las CR en -P.

Conocidas las diferencias en las estrategias de algunas plantas F2 para adaptarse mejor a suelos con bajas condiciones de fósforo, es necesario conocer si existen bases genéticas para las diferencias entre las plantas con más y menos biomasa.

Mediante el uso de cruza Z031E0058 tiene genoma de *parviglumis* en un fondo genético B73

Para mapear las regiones de *parviglumis* que se encuentran en Z031E0058, se aprovecharon datos existentes RNA-Seq para realizar un llamado de polimorfismos de un simple nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés). Al comparar Z031E0058 con el genoma de B73, se encontraron 33,954 SNPs que difieren entre ellos. Estos SNPs se encuentran en agrupados en los cromosomas 1, 2, 3 y 7, los cuales representan regiones de *parviglumis* dentro de Z0 (Figura 12).

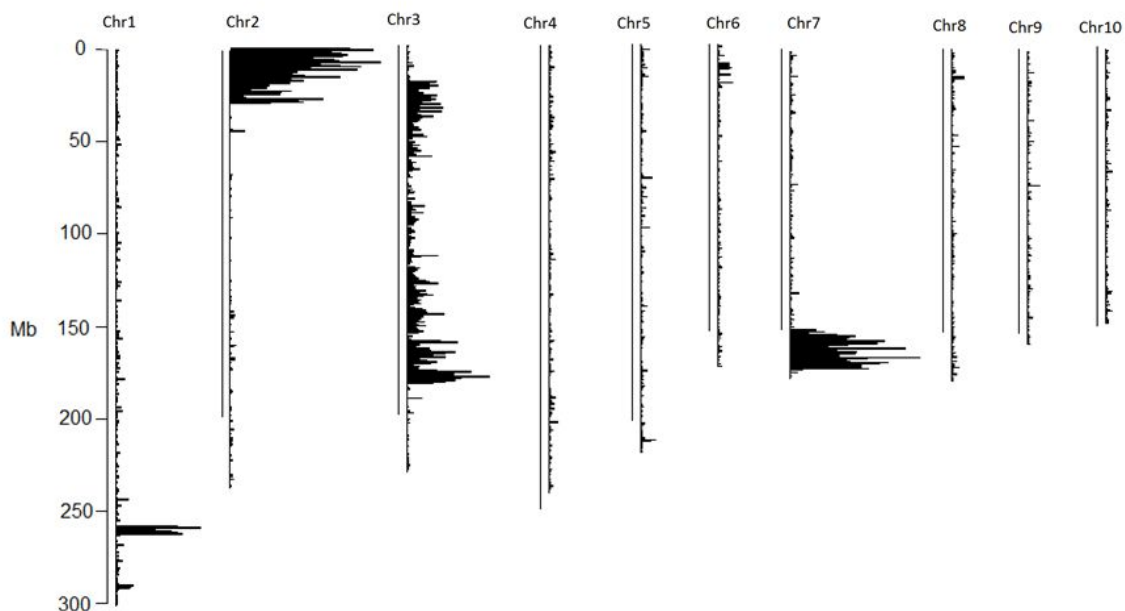


Figura 12. Z031E0058 contiene regiones de *parviglumis* en los cromosomas 1, 2, 3 y 7. La gráfica muestra los cromosomas de Z0 en forma de histogramas, en el eje Y se tienen la distancia en megabases (Mb) de los cromosomas. Los SNPs específicos no pertenecientes al B73 se muestran en forma de clusters en el cromosomas 1, 2, 3 y 7.

Las regiones se explican de manera más detallada en la tabla 2.

Cromosoma	Largo (Mb)	Comienza (Mb)	Termina (Mb)
1	6	259	265
2	32	0	32
3	157	23	180
7	20	150	170

Tabla 2. Descripción de las regiones que contienen SNPs específicos de *parviglumis* encontradas mediante RNA-Seq en Z031E0058.

Estas regiones concuerdan con lo sugerido por Flint-García (comunicación personal) en sus estudios previamente de genotipado mediante 1K SNP-Chip (tabla 3). Mediante 1K SNP-chip la densidad de marcadores para genotipar las regiones de *parviglumis* son menores que mediante RNA-Seq.

Cromosoma	Largo (Mb)	Comienza (Mb)	Termina (Mb)
1	-	259	259
2	26.6	1.2	27.8
3	150	32	182
7	13.6	157	170.6

Tabla 3. Descripción de las regiones de *parviglumis* encontradas por Flint-Garcia mediante SNP-Chip en Z031E0058.

Las regiones encontradas por estas dos técnicas fueron las mismas, con lo que se comprueba que existen regiones de *parviglumis* en los cromosomas 1, 2, 3 y 7 dentro de Z031E0058.

Dadas las características de las técnicas utilizadas para encontrar las regiones de *parviglumis*, sus posiciones varían muy poco. Por ejemplo, la región del cromosoma 1, con SNP-Chip (Flint-García, datos no publicados) solo nos dice que el marcador molecular es homocigoto para *parviglumis*, el marcador molecular únicamente prueba la región alrededor de 259 Mb. Sin embargo mediante el uso de RNA-Seq podemos saber que la región comienza en 259 y termina en 265. Por otro lado, una ventaja que podemos tomar de SNP-Chip es que nos puede decir si el estado es homocigoto o heterocigoto para cualquier parental. Las regiones en los cromosomas 1, 2 y 7 son homocigotas para *parviglumis* mientras que la región del cromosoma 3 es heterocigota.

Regiones de *parviglumis* se encuentran segregando dentro de las plantas de la familia F2.

Para seguir la segregación de las regiones de *parviglumis* en la generación F2, se probaron ocho marcadores moleculares SSR previamente reportados (<http://maizegdb.org>), los cuales permiten determinar si una determinada región es heterocigota u homocigota para cierto genotipo (Collard, B. C. Y. 2005). A lo largo de todas las regiones cromosómicas de *parviglumis* en Z031E0058, el marcador bnlg1331, que trabaja alrededor de 259 Mb del cromosoma 1 fue en único capaz de distinguir entre un genotipo u otro. Bnlg1331 utilizado para probar si la región del cromosoma 1 era la responsable de la diferencia entre fenotipos de la familia F2.

En la figura 13 se presenta la región del cromosoma 1, la cual se probó al momento de ser cosechadas las plantas. Las plantas muestran material genético, homocigoto para *parviglumis* (A), homocigoto para B73 (B) y heterocigoto (H) en proporción muy cercana a 1:1:2 respectivamente lo cual es esperado en herencia mendeliana . Se espera que lo mismo se encuentre sucediendo para las demás regiones de *parviglumis* de manera independiente (figura 14) y que la acción de estas regiones esten. De este modo se tienen alelos de B73 o *parviglumis* en bajas concentraciones de P en la misma región, los cuales pueden ser responsables de la habilidad de competencia en las plantas con más biomasa en bajas condiciones de fósforo.



Figura 13. Segregación dentro la región del cromosoma 1 en la familia F2. Dentro de la región hay condiciones homocigotas para B73 (B) y Z031E0058 (A); y heterocigotas (H), Q representa un control negativo (agua), 1: parental B73, 2 parental Z0

Conociendo que se tienen múltiples regiones de *parviglumis* segregando dentro de la familia F2 puede haber diferentes combinaciones entre ellas (figura 14).

Cromosomas Implicados

1	2	7
1	2	
	2	7
1		7
1		
	2	
		7

+

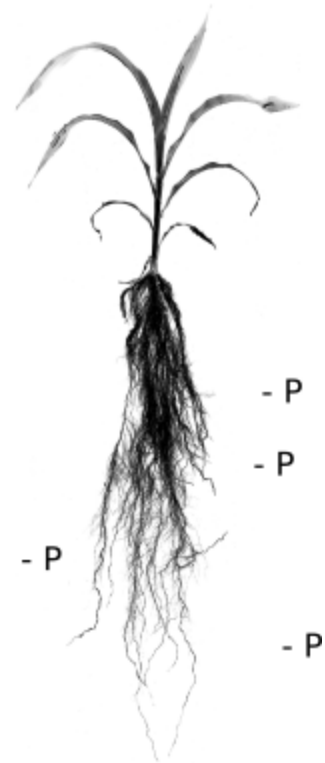


Figura 14. Posibles regiones que pueden proporcionar mayor tolerancia a suelos con bajas concentraciones de fósforo. El ejemplo se hace para las regiones homocigotas en los cromosomas 1, 2 y 7 y para el cromosoma 3 (rectángulo azul) el cual es heterocigoto para *parviglumis* dentro de Z0, en la que varias o una región estén controlando un fenotipo más favorable en - P.

No existen diferencias fenotípicas ligadas a la región del cromosoma 1 en las plantas con más y menos biomasa.

Para evaluar de manera más particular si la región del cromosoma 1 está implicada en la respuesta de las plantas con más biomasa -P se utilizó el marcador molecular SSR Bnlg1331.

Se probó si características medidas como el ratio de la raíz entre la parte aérea, el número de CR, la profundidad del sistema radicular y el peso del mismo en los primeros 30 cm de profundidad estaban ligadas a *parviglumis*, B73 o a una combinación entre estas en la región del cromosoma 1. En la Figura 15 se muestran estas características y su relación con alelos de *parviglumis* o B73. No se encontró ninguna de estas características ligada a la región del cromosoma 1 por lo que es necesario buscar en otras partes del genoma de las plantas de la familia segregante.

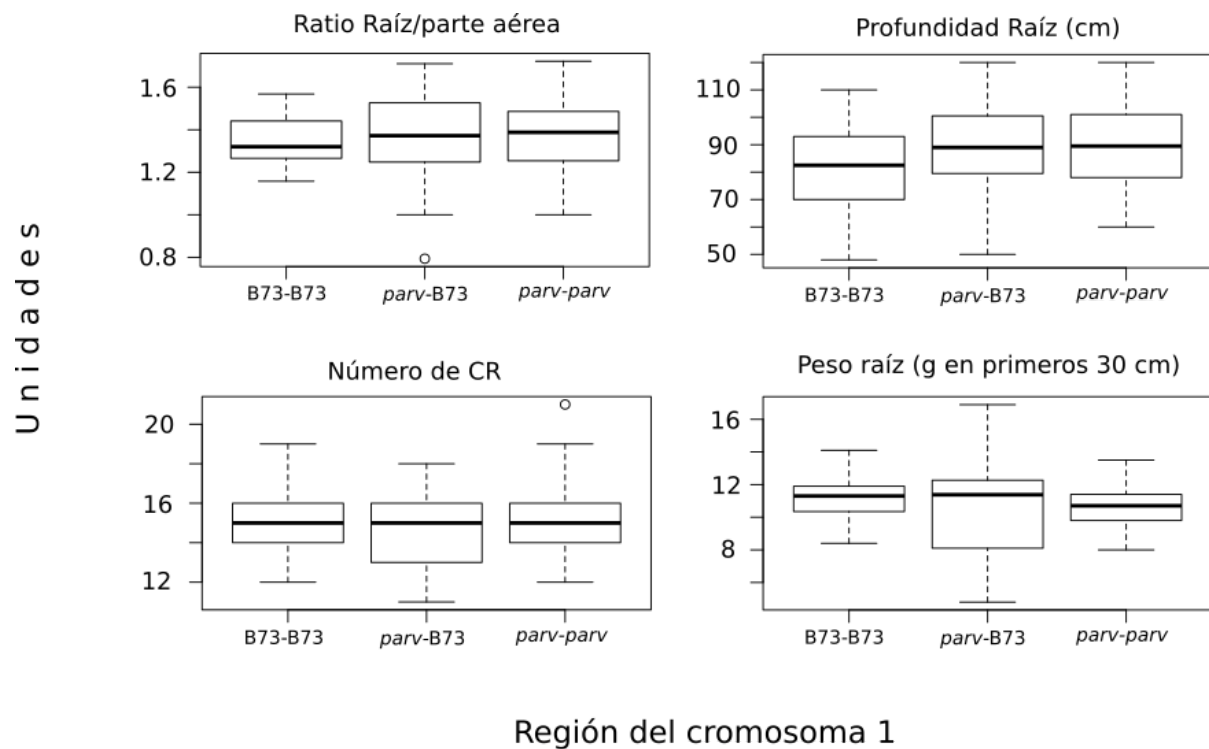


Figura 15. La región de *parviglumis* o B73 no muestra efectos en la variación de estos rasgos dentro del fondo genético B73 (p value =0.05, Kruskal-Wallis). La figura muestra la variación de rasgos como la proporción raíz/parte aérea, profundidad de la raíz, el número de CR y el peso de la raíz en la fuente de P en el experimento (primeros 30 cm) con respecto al material genético presente en la región del cromosoma 1 ($n = 104$)

La región del cromosoma 1 no es la responsable de las respuestas fenotípicas medidas en -P en la familia F2 (figura 15). Al no contar con marcadores útiles para las demás regiones, se utilizará la técnica de secuenciación GBS (Genotyping-by-Sequencing) (Elshire, R. J. et al 2011). GBS permite llamar variantes dentro del genoma. Mediante ésta técnica se buscarán región(es) cromosómicas de *parviglumis* que estén relacionadas con una mayor producción de biomasa dentro de la familia F2 en -P.

Buscar si existe la región candidata en plantas con introgresiones de *parviglumis* más finas.

Quedando descartada la región del cromosoma 1 como moduladora de la respuesta favorable en las plantas con mayor producción de biomasa, estamos a la espera de los resultados de GBS para determinar una posible región candidata. En campo actualmente se cuenta con una población la cual tiene 0.78% del genoma del *parviglumis* en donde podamos buscar la región candidata se encuentra presente para realizar más estudios de ella.

Conclusiones

- El sistema tradicional como el uso de cruzas constituye una herramienta poderosa para aprovechar la diversidad genética presente dentro de la misma especie, este proceso puede apoyarse en técnicas modernas como la genómica para entender y acelerar dicho proceso.
- Las plantas de la familia segregante tienen diferentes estrategias para responder a suelos con bajas concentraciones de fósforo.
- Mediante mecanismos morfológicos las plantas con más biomasa se adaptan a suelos con bajas concentraciones de fósforo.
- La región del cromosoma 1 no es la responsable de la variación fenotípica en -P en las plantas con más biomasa.

Perspectivas

- Obtener mediante GBS las regiones dentro de cada uno de los genotipos seleccionados.
- Con los grupos alélicos asignados a cada genotipo hacer una búsqueda para ver qué región o regiones comparten las plantas que se presentan una mejor tolerancia a suelos con bajos niveles de P.
- Diseñar marcadores moleculares que permitan seguir la/las region(es) dentro de la población.
- Probar la región candidata en altas y bajas condiciones de P para ver su comportamiento en cada condición.
- Conocer un posible gen que sea el que aporte el mayor porcentaje de tolerancia y su modo de acción.
- Ver el comportamiento de las plantas en diferentes tipos de estrés abiótico (Nutrientes, sequía) que involucra modificar el sistema radicular

Materiales y métodos

Material vegetal

Se utilizaron plantas de maíz BC4S4 pertenecientes a la familia Z031E0058 la cual tiene varias introgresiones de *Zea mays ssp. parviglumis* y un fondo genético perteneciente a B73 (*Zea mays ssp. mays*), una línea de referencia de maíz secuenciada (Schnable, P. S. et al. 2009) y mostró tener una mejor respuesta a -P. Se utilizó B73 como control para los experimentos.

Cruzamos la familia Z031E0058 con B73 nuevamente para obtener una F1 que posteriormente se autopolinizó para poder ver segregación en un familia F2 y poder discernir entre las tres regiones.

Condiciones de crecimiento

Se pasteurizó arena en las pasteurizadoras que se encuentran en el área de invernaderos, se les dió 4 horas para después dejar descansar otras cuatro o todo el día permitiendo a las esporas germinan para después con otra segunda pasteurizada se mueran “todas” y no tener efectos de micorrizas u otros microorganismos en los experimentos.

Para comprobar la respuesta de Z031E0058 a suelos con bajas concentraciones de fósforo, se llenaron tubos de PVC de medio metro de altura hasta $\frac{2}{3}$ partes del total con

solo la arena previamente pasteurizada, para llenar el último tercio se hizo una mezcla de arena con el 1.5% de alúmina cargada a un nivel de fósforo dado, 10 uM en bajas condiciones de fósforo y 333 uM.

Se sembraron dos semillas a una profundidad de 5 cm por tubo asegurando tener semillas germinadas en todos los tubos y no teniendo la necesidad de trasplantar porque esto nos puede afectar la forma en la que la planta se va desarrollando.

Para ver mas a detalle cual(es) es(son) las region(es) responsables de del fenotipo en -P de la familia F2. Se sembraron 104 individuos de la familia segregante en tubos de PVC de un metro de altura con arena y alúmina. Las concentraciones de alúmina para bajo y alto fósforo fueron respectivamente 10 uM y 333 uM, aplicando soluciones Hoagland desde el día diez después de la germinación y cada tercer dia con las mismas concentraciones de fósforo.

Preparación de alúmina

Se utilizó el protocolo de la universidad de Pennsylvania modificado (<http://plantscience.psu.edu/research/labs/roots/methods/methods-info/solid-phase-phosphorus-buffer-alumina-p>).

Paso 1. Pesar la alúmina

Se pesaron pequeños lotes de 1.2 kg de alúmina y se pusieron en recipientes de 14 litros.

Paso 2. Lavado de la alúmina

Se hizo un lavado con 4.2 litros de agua destilada, se agitó manualmente por 1 min y se desechó el agua. (nota: utilizar cubrebocas).

Paso 3. Humedecer la alúmina

Se agregaron 4.2 litro de agua destilada y se dejó por 30 min dentro de los cuales se agitaba con una cuchara cada 10 min, descartar completamente el agua.

Paso 4. Acidificar la alúmina

Se agregaron 3.78 litros de agua y se agitó, luego se añadió 0.42 litros de HCL 2.5 N y se dejó durante 1 hora con agitamientos cada 10 min.

Paso 5. Lavados con agua destilada para remover el ácido

Se realizaron tres lavados me media hora cada uno dentro de los cuales se agitaba cada 10 min, el agua se añadió fueron 4.2 litros y se renovaba tras cada lavado.

Paso 6. Cargar con fósforo

Para tener una carga final en la alumina de ~10 uM se añadió ~135 ml de Fosfato de potasio M (4.045 litros de agua destilada - 0.135 litros de Fosfato de potasio al 2 M) y se dejó toda la noche sin agitar.

Paso 7. Lavado para remover exceso de sales

Se agregó 4.2 litros de agua destilada durante media hora agitando cada 10 min.

Paso 8. Secado

Una vez que se ha drenado toda el agua del paso 7 se pasó a recipientes más extendidos que fueron llevados a 60 °C durante 24 horas.

Cuantificación del fósforo absorbido en la alúmina

Bien secadas las muestras, se pesaron 2 gramos de alúmina y se pusieron en 50 ml de agua mQ y se dejó por una hora en agitación.

Al cabo de la hora en un tubo eppendorf de 1.5 se pusieron 300 ul de cada muestra y se le agregó 600 ul de molibdato de amonio y 100 ul de ácido ascórbico a 4°C. se dejó incubar durante una hora a 42°C a agitación baja. Se midió absorbancia a 820 nm.

Preparación medio Hoagland

Para regar las plantas se utilizó una solución nutritiva Hoagland (Hoagland, D. R. & Arnon, D. I. 1936) la cual reúne los nutrientes necesarios para que se desarrolle de manera adecuada casi cualquier planta.

Lo primero fue preparar soluciones stock (medios A - E) con las concentraciones que me muestras en la tabla:

MEDIO	REACTIVO	CANTIDAD	UNIDADES
A	KNO3	10	<i>gramos</i> <i>litro</i>
	Ca (NO3)2·4H2O	1.18	
	Mg SO4·7H2O	4.93	
B	KH2PO4	13.6	
B-MIXER	KCl	7.4	
C	Fe EDTA	0.3605	
D	MnSO4·H2O	0.137	<i>gramos</i> <i>100 ml</i>
	ZnSO4·7H2O	0.02	
	CuSO4·5H2O	0.008	
E	Na2B4O7·10H2O(BORAX)	0.2	
	(NH4)6Mo7O2·4H2O	0.01	

A continuación se mezclan estos medios para preparar soluciones al 10X, para las diferentes concentraciones de fósforo.

1L Hoagland 30X	Alto P	Bajo P
Medio A	500 mL	500 mL
Medio B	100 mL	3 mL
Medio B-mixer	0 mL	97 mL
Medio C	100 mL	100 mL
Medio D	10 mL	10 mL
Medio E	10 mL	10 mL
H2O Destilada	280	280

Mediciones de las plantas

Para estudiar más el comportamiento de la parte aérea durante los tratamientos, se tomó el largo y ancho de las hojas y se multiplicó por 0.75 (Francis, C. A. et al. 1969).

Además, se tomaron otras medidas como el diámetro del tallo y la altura desde el suelo hasta el comienzo hoja más alta.

Colecta de material

Una vez que las plantas alcanzaron el lapso de días establecidos (36 días) para fenotipar las partes subterráneas de las mismas, se tuvieron que extraer de la arena como se muestra a continuación.

1. Extraer las plantas de la tierra (se retira el cincho y la malla de abajo y moviendo el tubo para que la tierra vaya cayendo la raíz se va extrayendo dañándola lo menos posible)
2. Se toman tres Crown Roots (CR) (cortando 2 mm de distancia desde el tallo) se pesan y se meten en tubos falcon de 50 ml con alcohol etílico (70%)
3. La planta se divide en tres secciones y se registra el peso fresco de cada una.
 - a. Parte aérea (comienza a partir de 2 cm después de las raíces de la corona).
 - b. Parte de la corona (empieza donde termina la parte aérea hasta 2 cm debajo de la semilla).
 - c. Raíz (debajo de la corona).
4. Tomar la raíz y meterla a una bolsa de papel.
5. Tomar las hojas y el tallo juntos.
6. Contar el número y los niveles de Crown roots, meter la sección a una bolsa de papel.

Llamado de SNPs

RNA-Seq permite además de cuantificar la expresión de genes, hacer un llamado de variantes (SNPs y/o Indels) dentro del genoma del individuo estudiado. Primero el RNA se tiene que convertir en una librería de cDNA con adaptadores, entonces cada molécula es secuenciada en un secuenciador de nueva generación para obtener pequeñas secuencias.

En trabajos previos realizados por el laboratorio por Odette et al. se tomaron tejidos para hacer un análisis de expresión mediante RNA-Seq también se formaron las librerías de cDNA y se mandaron a secuenciar, con lo que se tenía para continuar los reads crudos, se decidieron analizar con el pipeline de Genome Analysis Toolkit (GATK) (Figura 16)

(<https://www.broadinstitute.org/gatk/>) (Mckenna, A. et al, 2010)

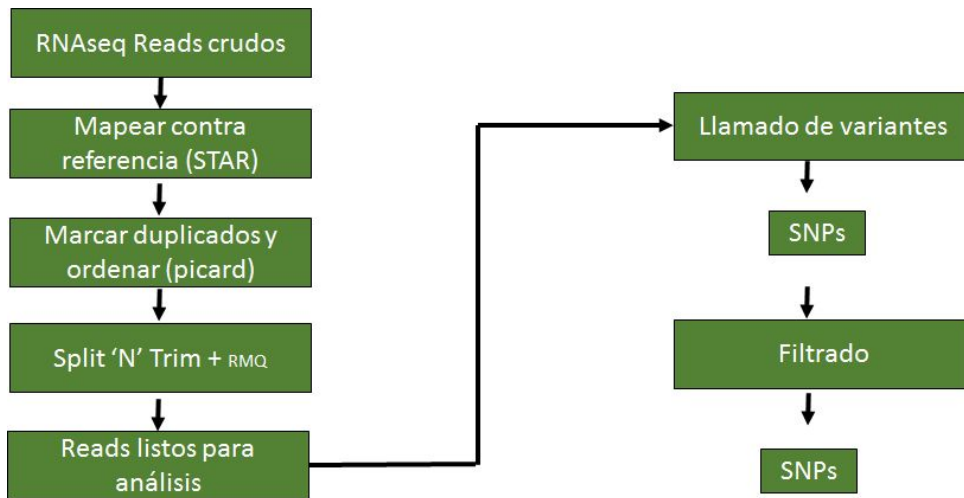


Figura 16. Diagrama de flujo para el llamado de SNPs con GATK.

Mapear contra genoma de referencia: Se realizó con el alineador STAR (Dobin, A et al. 2013). El alineamiento se realizó dos veces, la primera fue para encontrar los sitios de corte entre los exones y con la ayuda de éstos tener una mejor confiabilidad al mapear la segunda vez.

Ordenar y marcar duplicados: este paso se realizó con la ayuda de Picard tools (<https://broadinstitute.github.io/picard/>). Ordenar es importante para que GATK pueda trabajar mejor y marcar los duplicados, como los generados en la amplificación de las librerías, puede ayudarnos para no encontrar demasiados falsos positivos.

Split´N´Trim: esta ya es una herramienta del paquete GATK especial para los datos generados a partir de RNA, un “read” proveniente de RNA-Seq puede tener dos o más exones unidos, cuando este se alinea contra el genoma de referencia y sus exones son separados dejando la parte del intrón, esta es llenada con N´s, que pueden causar problemas en GATK, lo que se hace en esta operación es remover estas N´s.

A este punto tenemos nuestros reads listos para hacer el llamado de variantes mediante la herramienta **HaplotypeCaller(HC)** dentro de GATK. HC va buscando dentro del genoma, por ventanas, evidencia significativa de variación; una vez que la encuentra re-ensambla esta región y define haplotipos, el tercer paso consta de definir probabilidades a estos haplotipos, una vez que se tienen los mejores se analizan las probabilidades de cada genotipo (por sitio) con ayuda del teorema de bayes.

La salida de todo este proceso es un **archivo VCF** (Variant Calling File) al cual se le aplican filtros rigurosos, se realizó según lo recomendado por los desarrolladores del programa para RNA, filtrar clusters de al menos 3 SNPs dentro de ventanas de 35 pb.

Bibliografia

- Aerts, R., Boot, R. G. A., & Vandraart, P. J. M. (1991). The relation between aboveground and belowground biomass allocation patterns and competitive ability. *Oecologia*, (87) 551–559.
- Aerts, R. (1999). Interspecific competition in natural plant communities : mechanisms , trade-offs and plant – soil feedbacks. *J Exp Bot.* (50), 29–37.
- Benjamin Péret, et al. 2014. Root Architecture Responses: In Search of Phosphate. *Plant Physiology* (166)1713–1723.
- Bucher, M., & Bucher, M. (2007). Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phyto.* (173) 11-26.
- Casper, B. B., & Jackson, R. B. (2017). Plant Competition Underground Author Brenda B . Casper and Robert B . Jackson Source : Annual Review of Ecology and Systematics , Vol . 28 (1997), pp . 545-570 Published by : Annual Reviews Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2952504> JSTOR is a not-for-profit service that helps scholars , researchers , and students discover , use , and build upon a wide range of content in a trusted PLANT COMPETITION UNDERGROUND, 28(1997), 545–570.
- Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., & Pang, E. C. K. (2005). An introduction to markers , quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement : The basic concepts. *Euphytica* 169–196.
- Dobin, A., Davis, C. a, Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., ... Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(1), 15–21.
- Doebley, J. (2004). The genetics of maize evolution. *Annu. Rev. Gene*, 37–59.
- Douglas, A., Bolker, B., Walker, S., Singmann, H., Dai, B., & Ben, M. (2016). Package “lme4.”
- Elshire, R. J. et al (2011). A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLoS ONE* (6) e19379.
- Francis, C. A. et al. (1969). A rapid Method for Plant Leaf Area Estimation in Maize (*Zea mays* L.). *Crop Sci.* (9) 537-539

- Fukao, T. et al (2006). A Variable Cluster of Ethylene Response Factor – Like Genes Regulates Metabolic and Developmental Acclimation Responses to Submergence in Rice, *Plant Cell* (18) 2021–2034.
- Gamuyao, R. et al. 2012. The protein kinase Pstol1 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. *Nature* (488) 535–539.
- Gaudin, A. C. M., McClymont, S. A., & Raizada, M. N. (2011). The Nitrogen Adaptation Strategy of the Wild Teosinte Ancestor of Modern Maize, *Zea mays* subsp. *Parviglumis*. *Crop Sci.* (51) 2780–2795.
- Herrera-estrella, L. (2016). Phosphorus : The Underrated Element for Feeding the World Phosphorus : The Underrated Element World. *Trends in Plant Sci.* (21) 461-463.
- Hochholdinger, F. et al. 2004. From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals. *Trends in Plant Sci* (9)42-48
- Hochholdinger, F., & Tuberosa, R. (2009). Genetic and genomic dissection of maize root development and architecture. *Current Opinion in Plant Biology* (12) 172–177.
- Hufford, M. B. et al (2012). Comparative population genomics of maize domestication and improvement. *Nature Genetics*, 44(7), 808–811.
- Lana, U. G. P. et al (2007). A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum, *Nature Genetics* (39) 1156 - 1161.
- López-Arredondo, D. L. et al. (2014). Phosphate Nutrition : Improving Low- Phosphate Tolerance in Crops Phosphate Nutrition : Improving Low-Phosphate Tolerance in Crops. *Annual Review of Plant Biology* (65).
- Lynch, J. P. (2011). Root Phenotypes for Enhanced Soil Exploration and Phosphorus Acquisition: Tools for Future Crops. *Plant Physiology*, (156) 1041–1049.
- Lynch, J. P. (2013). Steep , cheap and deep : an ideotype to optimize water and N acquisition by maize root systems. *Ann Bot.* 112 (2): 347-357.
- Maron, L. G. et al (2013). Aluminum tolerance in maize is associated with higher MATE1 gene copy number. *PNAS* (13) 5241-5246.
- Matsuoka, Y. et al (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *PNAS* (99) 6080–6084.

- Mckenna, A. et al (2010). The Genome Analysis Toolkit : A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 1297–1303.
- Munns, R. et al (2012). Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. *Nature Biotechnology* (30) 360-364.
- Osmont, K. S. et al (2007). Hidden Branches : Developments in Root System Architecture. *Annual Review of Plant Biology* (58).
- Rellán-Álvarez, R., Lobet, G., & Dinneny, J. R. (2016). Environmental control of root system biology. *Annual Reviews Plant Biology*, (67) 1–26.
- Rose T. J. et al (2013). Enhancing phosphorus and zinc acquisition efficiency in rice: a critical review of root traits and their potential utility in rice breeding. *Ann Bot* (112) 331–345.
- Reynolds, H. L., & Antonio, C. D. (1996). The ecological significance of plasticity in root weight ratio in response to nitrogen : Opinion. *Plant and Soil* (185) 75–97.
- Ruiz Corral, J. A. et al (2008). Climatic adaptation and ecological descriptors of 42 Mexican maize races. *Crop Science*, (48) 1502–1512.
- Sánchez-calderón, L. et al (2005). Phosphate Starvation Induces a Determinate Developmental Program in the Roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Physiology*, (46) 174–184.
- Schmidt, J. E., Bowles, T. M., & Gaudin, A. C. M. (2016). Using Ancient Traits to Convert Soil Health into Crop Yield: Impact of Selection on Maize Root and Rhizosphere Function. *Frontiers in Plant Science* (7) 1–11.
- Schnable, P. S. et al (2009). The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. *Science*, (326) 1112–1115.
- Schwinning, S., & Weiner, J. (1998). Mechanisms determining the degree of size asymmetry in competition among plants. *Oecologia* (113) 447–455.
- Sood S, Flint-Garcia S, Willcox MC, Holland JB (2014) Mining natural variation for maize improvement: Selection on phenotypes and genes. In: Tuberosa R, Graner A, Frison E (eds) Genomics of plant genetic resources: volume 1. Managing, sequencing and mining genetic resources. Springer 615–649.
- Steffens, B., & Rasmussen, A. (2016). The physiology of advantageous adventitious roots. *Plant Physiology*, 44(0), 603–617.

Tenaillon, M. I. et al (2002) Patterns of diversity and recombination along chromosome 1 of maize (*Zea mays ssp. mays L.*). *Genetics* (162) 1401–1413.

Uga, Y. et al (2013). Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions. *Nature Publishing Group*, 45(9), 1097–1102.

Wright, S. I. al (2005) The effects of artificial selection on the maize genome. *Science* 308:1310–1314.