

**MEJORAMIENTO ASISTIDO POR MARCADORES MOLECULARES DE UNA
POBLACIÓN DE MAÍZ CON CAPACIDAD DE INDUCCIÓN DE HAPLOIDÍA**

Trabajo Final de Grado

Del alumno

Leonardo Sanchez

Este trabajo ha sido presentado como requisito
para la obtención del título de

Licenciado en Genética

Carrera

Licenciatura en Genética

UNNOBA

Reforma Universitaria

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales

Pergamino, 4 de diciembre de 2023

**MEJORAMIENTO ASISTIDO POR MARCADORES MOLECULARES DE UNA
POBLACIÓN DE MAÍZ CON CAPACIDAD DE INDUCCIÓN DE HAPLOIDÍA**

Trabajo Final de Grado

del alumno

Sanchez Leonardo

Aprobado por el tribunal evaluador

Daniel Presello

Evaluador/a

Erika Mroginski

Evaluador/a

Roberto Lorea

Evaluador/a

María Agustina Affinito

Co- Directora

Gerardo Giomi

Director

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales, Universidad
Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 23 de diciembre de 2023

Agradecimientos

Queridos profesores, compañeros y seres queridos,

Hoy me dirijo a todos ustedes con un corazón lleno de gratitud y emoción al finalizar mi trabajo final de grado. Ha sido un viaje largo y desafiante, pero gracias al apoyo incondicional de todos ustedes, he logrado alcanzar este importante hito en mi vida académica. Me complace expresar mi más profundo agradecimiento a cada persona que ha contribuido a mi éxito y crecimiento durante este proceso.

En primer lugar, quiero agradecer a profesores y tutores. Su guía, conocimiento experto y dedicación han sido fundamentales para mi formación académica. Gracias por su paciencia al responder mis preguntas, por sus valiosas sugerencias y por desafiarme constantemente a ir más allá de mis límites. Sus enseñanzas han sido una luz en mi camino y han dejado una huella duradera en mí.

A mis facu-amigos, gracias por ser una fuente constante de apoyo. Juntos hemos compartido risas, estrés y momentos inolvidables. A través de nuestras discusiones, debates y colaboraciones, hemos enriquecido nuestra comprensión del tema y hemos crecido como individuos. Han sido una parte indispensable de mi experiencia universitaria y les agradezco por ser parte de mi viaje.

A mi familia y amigos, gracias por su amor, aliento y paciencia inquebrantables. Han sido mi red de seguridad emocional, brindándome el apoyo y la confianza necesarios para seguir adelante. Sus palabras de aliento y abrazos reconfortantes me han dado la fuerza para superar los desafíos y perseverar en mi camino hacia el logro de mis metas. No puedo expresar con palabras cuánto significan para mí, pero espero que sepan que siempre llevaré su amor en mi corazón.

Este trabajo final de grado no es solo mi logro, sino también un testimonio de la poderosa red de apoyo que me rodea. Gracias a todos los que han sido parte de mi viaje, desde el principio hasta este glorioso final. Su impacto en mi vida es invaluable y siempre estaré agradecido.

Con profunda gratitud

Leonardo Sanchez.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
Maíz (<i>Zea mays</i> L.).....	3
Maíz en Argentina.....	4
Mejoramiento del Maíz.....	5
Tecnología de duplicación de haploides.....	6
Capacidad de inducción.....	8
Métodos de identificación de haploides.....	9
Mejoramiento Asistido por Marcadores Moleculares para la inducción de haploidía.....	11
Mejoramiento de inductores de haploidía en la EEA INTA Pergamino.....	13
Hipótesis.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Identificación de alelos del gen Matrilineal (<i>MTL</i>) y relación con la capacidad de inducción de la línea M741H.....	17
Material Vegetal.....	17
Diseño de <i>primers</i>	17
Extracción de ADN.....	20
Genotipado de plantas mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	20
Evaluación de la capacidad de inducción por cruzamientos de prueba.....	21
Evaluación de caracteres agronómicos de M741H y F1 <i>ind</i>	22
Obtención de líneas haploides duplicadas (HD) derivadas del cruzamiento de la línea inductora M741H con tres híbridos experimentales.....	22
Material Vegetal.....	22
Siembra y germinación bajo condiciones controladas de laboratorio.....	23

Duplicación cromosómica.....	23
Manejo de las líneas HD.....	23
Marcadores geno-fenotípicos.....	24
Análisis estadístico.....	24
RESULTADOS.....	26
Puesta a punto de una herramienta molecular para identificar alelos mutantes del gen Matrilineal (<i>MTL</i>).....	26
Genotipado de la línea M741H.....	27
Selección asistida por el marcador MTL70 en la población F1 <i>ind</i>	29
Evaluación de caracteres agronómicos de la línea M741H y la población F1 <i>ind</i>	30
Puesta a punto de una técnica para generar líneas haploides duplicadas (HD) de Maíz	31
Marcadores geno-fenotípicos.....	31
DISCUSIÓN.....	38
Puesta a punto de una herramienta molecular eficiente y reproducible para identificar alelos mutantes del gen Matrilineal (<i>MTL</i>).....	38
Mejoramiento asistido por marcadores moleculares del alelo mutante <i>mtl</i> del gen <i>MTL</i> en la población F1 <i>ind</i>	39
Evaluación de caracteres agronómicos en la línea M741H y en la población F1 <i>ind</i>	40
Obtención de líneas haploides duplicadas (HD) derivadas del cruzamiento de la línea inductora M741H con tres híbridos experimentales del programa de mejoramiento de INTA.....	40
CONCLUSIONES.....	45
BIBLIOGRAFIA.....	47

RESUMEN

El maíz (*Zea mays* L.) es una planta C4 con alta actividad fotosintética, originaria de América y vital para la agricultura argentina. Aunque el cultivo de la especie ya se ha establecido mundialmente en diferentes ambientes como un cultivo de mucha importancia económica, aún enfrenta desafíos como la competencia contra malezas y la resistencia a herbicidas o la tolerancia a enfermedades, entre otros. Continuamente se están desarrollando tecnologías que ayudan a los mejoradores a acelerar la obtención de híbridos con mayores potenciales de rendimiento y sanidad.

Una herramienta utilizada actualmente en programas de mejoramiento de maíz es la tecnología de haploides duplicados (DH). La tecnología DH, que acelera la obtención de líneas homocigotas para la posterior producción de híbridos, depende de materiales genéticos particulares llamados inductores de haploidía. Otra tecnología ampliamente utilizada en el mejoramiento es la Selección Asistida por Marcadores Moleculares (MAS), que se ha aplicado a inductores de haploidía para lograr mejores resultados en la producción de líneas DH.

En el presente trabajo final de grado, se trabajó en mejorar la línea inductora M741H, buscando adaptación local y eficiencia en la inducción de haploides. El germoplasma de maíz utilizado incluyó diversas líneas e híbridos experimentales. Se llevaron a cabo tareas de laboratorio e invernáculo, que abarcaron la identificación de alelos del gen *Matrilineal* (*MTL*), mediante el diseño de cebadores específicos, en la línea M741H y en una población F1 *ind* derivada del cruzamiento entre M741H y un híbrido experimental de INTA. En el campo, se realizaron siembras y polinizaciones dirigidas, incluyendo cruzamientos manuales y la recombinación de individuos de la población F1 *ind*. Además, se realizó la evaluación agronómica de F1 *ind* comparándola con M741H. Por otra parte, se obtuvieron líneas haploides duplicadas a partir del cruzamiento de la línea inductora M741H con tres híbridos experimentales y se puso a punto una herramienta molecular para diferenciar individuos haploides de diploides.

Los resultados demostraron que la presencia del alelo mutante del gen *MTL* es determinante para el aumento de la capacidad de inducción. En la evaluación agronómica, la población *F1ind* mostró mejoras significativas en diversas características en comparación con la línea inductora M741H, presentando un fenotipo con mejor adaptación a las condiciones edafoclimáticas de nuestra zona. Por otra parte, se logró éxito en la obtención de líneas DH a partir de tres híbridos del programa de mejoramiento de maíz de la EEA INTA Pergamino utilizando M741H como inductor. Se encontró que el SSR *bnlg1367* puede utilizarse como herramienta molecular para confirmar haploidía mediante el descarte de individuos portadores del alelo de la línea M741H (diploides).

Como conclusión se destaca el desarrollo con éxito de una herramienta molecular eficiente y reproducible para identificar los alelos mutantes del gen *MTL*. Esto representa un avance significativo para el programa de mejoramiento de maíz de INTA, incentivando a continuar con la utilización de MAS para éste y otros caracteres de interés.

INTRODUCCIÓN

Maíz (*Zea mays* L.)

El maíz (*Zea mays* L.) es una planta C4 con una alta actividad fotosintética y gran potencial para producir carbohidratos por unidad de superficie por día. A lo largo de su historia productiva este cultivo ha experimentado importantes transformaciones tecnológicas, como la aparición de híbridos, que impulsaron una revolución agrícola global. El maíz es originario de América y está estrechamente asociado con las culturas precolombinas. Su origen geográfico, según la escuela rusa de Vavilov, se encuentra en el sur de México y norte de América Central, donde existen diversos parientes silvestres, como los teosintes y los integrantes del género *Tripsacum* (Golik *et al.*, 2018).

En cuanto a la morfología del maíz, presenta un sistema radical compuesto por raíces seminales y adventicias, estas últimas originadas en los nudos subterráneos (Andrade, 1995). El tallo está formado por nudos y entrenudos sólidos y puede variar en altura según el cultivo y las condiciones ambientales. El maíz puede desarrollar macollos, que son ramificaciones laterales que surgen de yemas en los nudos subterráneos. Las hojas del maíz incluyen los cotiledones, coleóptilo, prófalo, brácteas (chalias, glumas y glumelas) y las hojas normales con vaina, lígula, aurículas y lámina. Las hojas superiores son más eficientes en la fotosíntesis (Golik *et al.*, 2018).

El maíz es una planta diclino monoica, con una inflorescencia estaminada llamada panoja o penacho y una inflorescencia pistilada llamada espiga o mazorca. La panoja consta de un eje principal con ramificaciones laterales en espiral, y en ellas se disponen las espiguillas bifloras. Cada espiguilla contiene dos flores, una superior y otra inferior, pero generalmente la flor inferior aborta (Aldrich & Leng, 1974). El maíz puede presentar diferentes anomalías genéticas en la disposición y desarrollo de las espiguillas. La polinización del maíz es principalmente anemófila, dependiendo del viento para transportar el polen. La receptividad de los estigmas

se mantiene durante aproximadamente 14 días, lo que permite la polinización cruzada, aunque también puede ocurrir cierta autofecundación.

Maíz en Argentina

En Argentina, la agricultura desempeña un papel fundamental en la economía del país. La extensión de tierra destinada a actividades agropecuarias es enorme, alcanzando aproximadamente 190 millones de hectáreas (INDEC, 2018). Cuatro cultivos, en particular, tienen un papel destacado en la agricultura argentina: trigo, maíz, girasol y soja. Aunque en el pasado muchas regiones eran mixtas, combinando agricultura y ganadería (Satorre, 2005), en los últimos años ha habido una marcada expansión de las técnicas agrícolas y una reducción de la ganadería en favor de cultivos como la soja y el maíz (Bilello *et al.*, 2009).

Sin embargo, en los últimos años, el cultivo de maíz ha resurgido como una opción de mayor rentabilidad económica, y además ofrece beneficios a largo plazo para la sustentabilidad de los sistemas de producción agrícola. El maíz es uno de los cereales más importantes y productivos a nivel mundial, con múltiples usos en la alimentación humana, animal e industrial.

En Argentina, el maíz ocupa una extensión significativa de aproximadamente 7,3 millones de hectáreas y es el segundo cultivo más importante del país. En la campaña 2022/2023, la producción de maíz alcanzó aproximadamente 34 millones de toneladas, lo que posiciona a Argentina como el segundo productor y el tercer exportador mundial de este cultivo (BCBA, 2023).

El cultivo enfrenta desafíos como la competencia de malezas durante las primeras etapas de su ciclo de crecimiento, lo que puede llevar a pérdidas importantes en el rendimiento. Para controlar las malezas, se han utilizado herbicidas como el glifosato, pero el uso continuo de este herbicida ha llevado al desarrollo de malezas resistentes. Por lo tanto, se requiere una gestión adecuada y la combinación de diferentes estrategias para mantener la eficacia de los controles. A pesar de los desafíos, el maíz sigue siendo un cultivo de gran importancia para la sustentabilidad del sistema productivo en Argentina. El mejoramiento genético y

las nuevas técnicas de manejo han contribuido al aumento del rendimiento y la factibilidad de su producción en diversas áreas del país.

Mejoramiento del Maíz

En el mundo existe la necesidad de aumentar la producción total de alimentos en un 70 % para satisfacer las demandas de los 9.700 millones de habitantes que se esperan para el 2050, bajo la disminución de los recursos naturales como la tierra cultivable y el agua. La primera revolución verde se basó en la adopción de variedades de élite con mejores prácticas de manejo seguidas de la adopción de híbridos, particularmente en cultivos de polinización cruzada. Los híbridos son los mejores candidatos para aprovechar al máximo la heterosis y lograr ganancias genéticas rápidas en el maíz (Gupta, 2022).

La producción eficaz de semillas híbridas se basa en la producción de líneas endogámicas adaptadas y productivas. La tecnología de producción de haploides duplicados o dobles haploides (DH, *doubled haploid* en inglés) ha surgido como una herramienta potencial para impulsar la producción de semillas híbridas a través de la generación rápida de endogamia de élite (Prigge *et al.*, 2012). Considerando que la ganancia genética está definida según la siguiente ecuación:

$$G = \frac{i h^2 \sigma_p}{t}$$

donde i es la intensidad de selección, h^2 es la heredabilidad del carácter en sentido estricto, σ_p es el desvío fenotípico y t es el tiempo; las líneas DH incrementan la ganancia al influenciar positivamente sobre la heredabilidad, debido a que toda la varianza genética de las líneas es aditiva por ser todos los *loci* homocigotas, y al reducir el tiempo, acortando el proceso para lograr la endogamia (Boerman *et al.*, 2020).

Tecnología de duplicación de haploides

Un haploide duplicado es un genotipo que se forma cuando las células de un organismo haploide (n) experimentan un proceso, espontáneo o inducido artificialmente, de duplicación cromosómica ($2n$). Chase (1947, 1951, 1952, 1969) fue el primero en estudiar los haploides de maíz y utilizar líneas DH en el mejoramiento. La tecnología DH acorta el ciclo de mejoramiento de manera considerable porque hace posible un rápido desarrollo de líneas totalmente homocigotas en pocas generaciones. La generación de DH lleva aproximadamente 2 años, en comparación con el proceso convencional que demora por lo general de 6 a 8 generaciones para obtener líneas con aproximadamente un 99 % de homocigosis, es decir, de 6 a 8 años trabajando solo en una estación o de 3 a 4 años trabajando en contraestación, tal como se observa en la imagen 1. La técnica de producción de haploides duplicados es un procedimiento habitual para obtener líneas homocigotas de maíz dentro de empresas del sector semillero e instituciones públicas como CIMMYT, que realiza investigación y también brinda servicio a empresas (Prassana *et al.*, 2013).

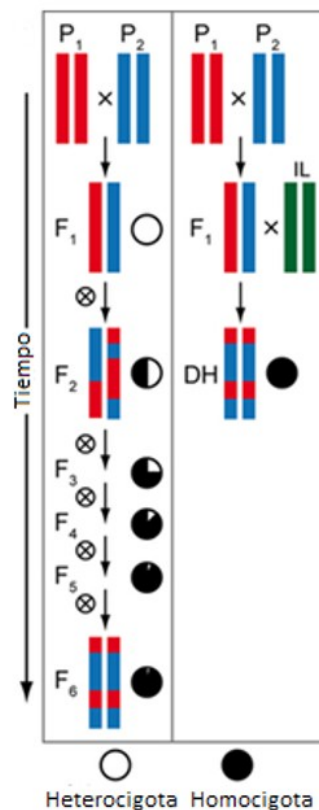


Imagen 1: Comparación del tiempo y la cantidad de generaciones para llegar a obtener líneas puras utilizando el método tradicional de mejoramiento (a la izquierda, 6 a 8 generaciones) y utilizando el método de haploides duplicados (a la derecha, 2 generaciones). Imagen adaptada de Melchinger *et al.* (2013).

La técnica *in vivo* de producción de DH depende de la utilización de genotipos llamados inductores de haploidía que actúan como polinizadores. Estos se cruzan con un material fuente (por lo general una F1, F2, o BC1) para producir un pequeño porcentaje de las semillas con embriones haploides. A partir de ellas, por duplicación del número cromosómico, se obtienen las líneas DH (Coe, 1959).

Las líneas DH, cuando se utilizan en programas de mejoramiento de maíz, ayudan a aumentar la eficiencia de la selección debido a una mayor variación genética aditiva, sin variación de dominancia, sin segregación dentro de la familia y una mayor precisión para estimar el valor genotípico (Forster & Thomas, 2005; Seitz, 2005). Debido a que los tiempos para producir líneas endocriadas como futuros parentales de híbridos se reducen en gran medida, el uso de la tecnología DH afecta positivamente la ganancia genética realizada y reduce el tiempo demandado para obtener un híbrido mejorado y llegar a su comercialización (Geiger & Gordillo, 2009).

Los inductores son líneas o poblaciones que cuentan con dos características esenciales para la producción de DH *in vivo*: la capacidad de inducción (*haploid-induction rate*, HIR) y que poseen marcadores genéticos que permiten diferenciar fenotípicamente las semillas haploides de las no haploides (Xu *et al.*, 2013; Weber, 2014; Wu *et al.*, 2014). Todas las plantas con flores se caracterizan por una forma particular de reproducción sexual llamada doble fecundación. Consiste en dos eventos de fusión paralelos entre gametos masculinos y femeninos (Imagen 2). El óvulo haploide es fertilizado por un gameto masculino haploide y se convierte en el embrión diploide. Al mismo tiempo, el núcleo diploide de la célula central es fertilizado por el segundo gameto masculino haploide del mismo tubo polínico para formar un tejido nutritivo semilla, el endospermo triploide (Imagen 2). La polinización por una línea inductora de maíz da como resultado un evento de

fertilización atípica en el que solo la célula central es fertilizada normalmente por un gameto masculino y el óvulo se convierte en un embrión haploide que carece del genoma paterno (Imagen 2). Se debe tener en cuenta que después de realizar la polinización con una línea inductora de maíz, solo alrededor del 5 % de las semillas en desarrollo contienen un embrión haploide, el 95 % restante son embriones diploides normales (Gilles *et al.*, 2017). Cabe destacar que así como una cantidad de semillas resultan haploides, otra misma cantidad de semillas sufren fecundación en el ovulo ($2n$), pero no en el endospermo ($2n$), y pierden su capacidad de germinación, es decir, estos fenotipos son letales (Prasanna, 2013).

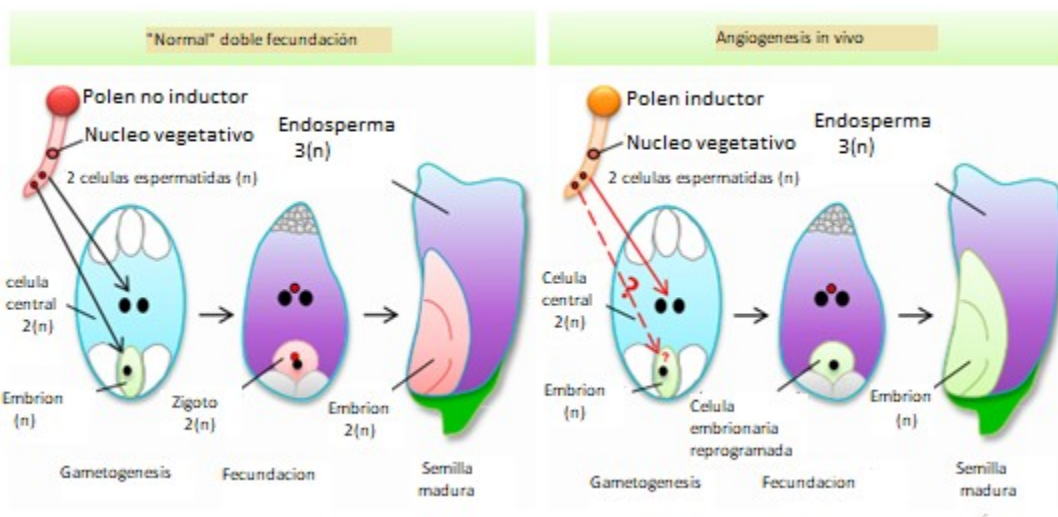


Imagen 2: Comparación de la doble fecundación normal, en la cual se forma el embrión $2n$ y el endospermo $3n$ a partir del óvulo haploide y el polen de un individuo no inductor con la fecundación anormal cuando se involucra un inductor y se forma un embrión n y un endospermo $3n$. Imagen adaptada de Gilles *et al.* (2017).

Capacidad de inducción

Cuando se utiliza un inductor como progenitor masculino, éste se denomina inductor de haploides de origen materno, porque solo el genoma de la planta donante femenina se transmite a los embriones haploides. También existen haploides de origen paterno (derivados del polen), poco usados en el

mejoramiento. La inducción de haploides de origen materno y paterno está controlada por diferentes genes y, por lo tanto, se emplean diferentes inductores en función del método de inducción de haploides utilizado (Trentin, 2020).

La tasa de inducción de haploidía (*haploid induction rate*-HIR) de los inductores se calcula como el número de semillas haploides dividido por el número total de semillas producidas, y es el parámetro común para comparar la eficiencia de inducción de diferentes inductores (Trentin, 2020). Desde el descubrimiento de Chase (1949) de la inducción natural en maíz (un HIR menor a 0,1 %), se generaron una amplia gama de líneas inductoras con diferentes HIR tanto en Europa (Schmidt, 2004) como en Estados Unidos (Seitz, 2005) y China (Li *et al.*, 2009). La HIR también depende de si el inductor es de origen paterno o de origen materno. Se han creado inductores de haploides de origen paterno con un HIR de hasta el 6 % (Kindiger, 1993), pero se logró mucho más progreso en los inductores de haploides de origen materno, donde las tasas pueden llegar hasta cerca de un 15 % (Rotarenco *et al.*, 2010).

En el presente trabajo, se utilizó una línea inductora de haploides de origen materno llamada M741H, la cual posee una tasa de inducción teórica del 2,2 % (Eder *et al.*, 2002).

Métodos de identificación de haploides

Diversos autores (Chase y Nanda, 1965); Nanda y Chase, 1966; Greenblatt y Bock, 1967) describieron un marcador fenotípico basado en antocianinas para la identificación de haploides inducida por el alelo R1-nj del gen R1 que regula la biosíntesis de antocianina. La expresión de R1-nj requiere otros genes estructurales implicados en la vía de biosíntesis de antocianinas, como A1, A2, C2, Bz1, Bz2 y de genes reguladores como C1 (Chase, 1969; Geiger, 2009). La expresión fenotípica de R1-nj, denominada fenotipo "Navajo", es la más importante para la técnica en cuestión y consiste en la formación de una coloración púrpura en la capa de aleurona en la región de la corona del endospermo y el escutelo del embrión del material fuente a inducir (Nanda &

Chase, 1966; Greenblatt & Bock, 1967). Como se ve en la imagen 3 en un cruzamiento entre el germoplasma de origen sin coloración antociánica y un inductor haploide con el sistema marcador R1-nj, la progenie muestra una coloración púrpura / roja tanto en el endospermo como en el embrión diploide, mientras que los supuestos granos haploides exhiben una coloración púrpura en el endospermo, pero no en el embrión, lo que facilita la identificación visual de los granos haploides (Chaikam *et al.*, 2018). También se ha propuesto otro método de identificación haploide basado en el contenido de aceite del grano que es adaptable a un proceso automatizado (Rotarencu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Melchinger *et al.*, 2013, Melchinger *et al.*, 2014).

Un método utilizado para la valoración de la capacidad de inducción consiste en la evaluación de la descendencia de cruzamientos con la línea B73 *liguleless* (sin lígula), la cual presenta en estado homocigota alelos mutantes recesivos del gen *LIG-1* determinante para la expresión de lígulas y aurículas. Sólo las semillas haploides no expresan lígulas, y este marcador puede verse en etapas tempranas del desarrollo de la planta (Gilles *et al.*, 2017).

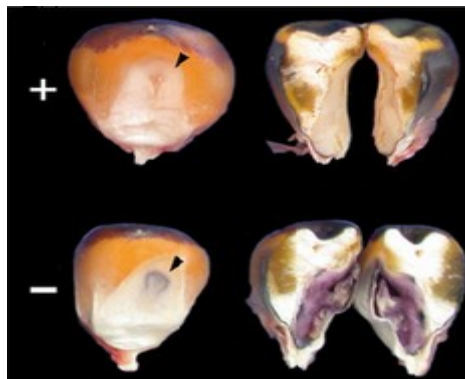


Imagen 3: Comparación entre una semilla normal 2n (-) y una semilla haploide n (+). El inductor tiene el marcador de color (antocianinas R1-nj). La semilla (+) es haploide: el endospermo está marcado y el embrión no. La semilla (-) es diploide: tiene marcado tanto el endospermo como el embrión. Imagen editada de Melchinger *et al.* (2013).

Mejoramiento Asistido por Marcadores Moleculares para la inducción de haploidía

La Selección Asistida por Marcadores Moleculares (MAS, del inglés *Marker Assisted Selection*) permite hacer mucho más eficientes las estrategias de selección en los programas de mejora de los cultivos. La MAS ganó una considerable importancia en el incremento de la eficiencia de la mejora de las plantas, al permitir transferir regiones genómicas de interés de forma más precisa que los métodos clásicos de selección. Ha sido empleada ampliamente para caracteres de herencia simple y en la mejora de caracteres cuantitativos.

El uso de marcadores moleculares para el desarrollo de inductores fue impulsado recientemente a partir de la descripción de la base genética de inductores de haploides de origen materno por tres grupos de trabajo independientes casi en simultáneo (Gilles *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017; Kelliher *et al.*, 2017). La inducción de haploides en el maíz se desencadena por una mutación que corre el marco abierto de lectura en el gen denominado MATRILINEAL (*MTL*), que codifica para una fosfolipasa específica del polen. La inserción de 4 pares de bases genera un codón de detención prematuro en el mRNA y una nueva enzima más corta en 29 aminoácidos, que aún presente y parcialmente activa, conduciría a explicar la producción de semillas haploides. Estos estudios se basaron en el trabajo de Barret y colaboradores (2008) que identificaron un locus principal que centra la inducción de haploides *in vivo* en el bin 1.04 (Imagen 4), misma región identificada por Röber (2005). La región qhir1 en el bin 1.04 no solo desencadena la inducción haploide, sino que también provoca la distorsión de la segregación gametofítica y el aborto embrionario (Barret *et al.*, 2008; Prigge *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013). Varias rondas de mapeo fino redujeron este locus de rasgos cuantitativos a una región de aproximadamente 0,57 Mb que contenía siete genes como se ve en la imagen 4 compatibles con qhir11, una subregión de qhir1 (Boch *et al.*, 2009). Los autores demuestran que todos los genotipos inductores derivados del inductor Stock6 informado por Chase (1959), incluida la línea M741H que se utilizó en el presente trabajo, poseen este alelo mutante asociado a la capacidad de inducción de haploides.

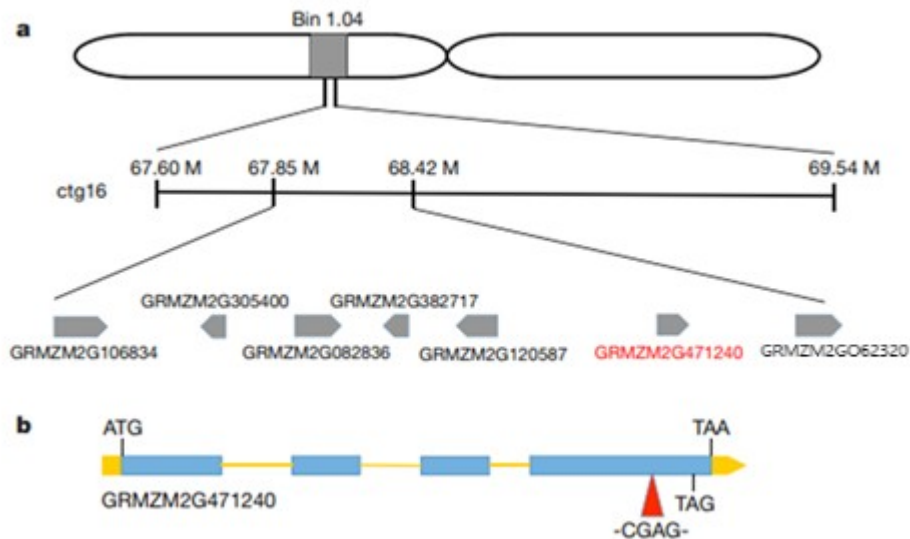


Imagen 4: (a) QTL en el bin 1.04 identificado por Barret *et al.* (2008) como importante en la inducción de haploidía. La región contiene 7 genes. (b) Estructura del gen *MTL* (*GRMZM2G471240*) y lugar de la inserción de los 4 pares de bases que cambian el marco de lectura generando la capacidad de inducir haploides. Imagen adaptada de Kelliher *et al.* (2017).

Si bien la selección fenotípica sigue siendo el enfoque más confiable para seleccionar caracteres que pueden determinarse fácilmente, la utilidad de estos marcadores permitió que diversas empresas e instituciones puedan realizar el mejoramiento de inductores para adaptarlos a sus distintos ambientes.

En nuestro país con los inductores públicos disponibles, la producción eficiente y a gran escala de líneas DH en zonas templadas productoras de maíz podría verse seriamente afectada dado el poco vigor, la escasa producción de polen, la escasa formación de semilla y el alto grado de susceptibilidad al quebrado y/o vuelco que presentan.

Mejoramiento de inductores de haploidía en la EEA INTA Pergamino

En la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) de Pergamino del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), se comenzó a trabajar en el mejoramiento de la de una línea inductora M741H. Este material posee una tasa de inducción teórica de 2,2 % (Eder *et al.*, 2002), un marcador de color por expresión de antocianinas (R1-nj), y una mala adaptación a nuestra región. A partir del cruzamiento de M741H (donante = D) y el híbrido experimental LP29xLP4703-1 (recurrente = R) se obtuvo una población BC2S2. Esta presentó atributos de mejor adaptación al ambiente local que M741H, pero una baja tasa de inducción de semillas haploides cuando se realizaron los cruzamientos de prueba por B73 *liguleless* (1,05 %). Esto puede deberse, como explica Prasanna *et al.* (2013), a que los factores genéticos asociados a la inducción de haploidía son seleccionados en contra por la naturaleza, por lo que es de esperarse que estos factores se vayan perdiendo durante las sucesivas generaciones. Se realizó entonces una nueva cruce de la población por M741H para reintrogresar los genes asociados a la capacidad de inducción de haploidía, generando una población segregante para todas las características deseables. Esta población BC2S2 cruzada nuevamente con el donante “[(((DxR)xR)xR)@.@.) x D]” fue denominada en el presente trabajo como F1*ind* (Imagen 5).

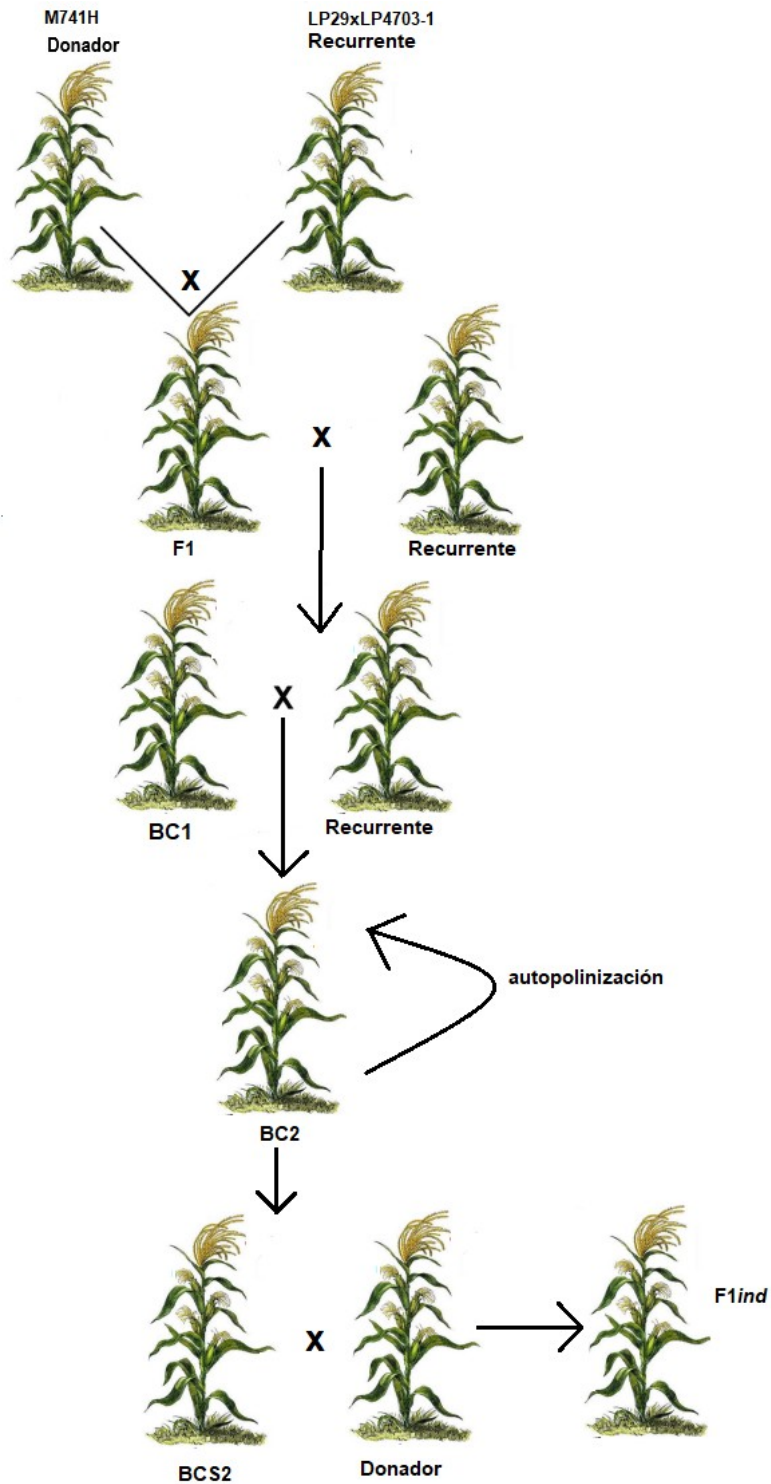


Imagen 5: Esquema de mejoramiento de la línea M741H. En la imagen se detalla la introgresión del alelo mutante del gen *MTL* de la línea M741H (donador) al híbrido experimental LP29xLP4703-1 (recurrente). Durante el proceso de mejoramiento hubo una pérdida de la capacidad inductora de la población por lo cual se volvió a cruzar por el material donador.

Para trabajar con inductores de haploidía se necesita extrema precaución, ya que, si una línea inductora llegase a sufrir una leve contaminación con un germoplasma foráneo, se seleccionarían naturalmente los alelos provenientes del genotipo no inductor y se perdería su capacidad de inducción, por lo que es imprescindible realizar ensayos que permitan mantener esta característica en el tiempo.

En el presente trabajo se realizó el genotipado y fenotipado de la población F1 *ind* a fin de identificar de manera rápida y confiable aquellos individuos fenotípicamente superiores y con capacidad de inducción de semillas haploides.

Hipótesis

Existen genotipos con capacidad de inducción de haploidía en la población F1 *ind*, derivada del cruzamiento de la línea inductora M741H y un híbrido adaptado al ambiente de Pergamino, y estos pueden identificarse mediante el genotipado del gen MATRILINEAL.

Objetivo general

Realizar el mejoramiento asistido de una población F1 *ind* derivada del cruzamiento de una línea con capacidad de inducción de semillas haploides y un híbrido adaptado al ambiente de Pergamino, provincia de Buenos Aires.

Objetivos específicos

- Poner a punto una herramienta molecular eficiente y reproducible para identificar los alelos mutantes del gen Matrilíneal (*MTL*) en inductores de haploidía en maíz.
- Realizar la selección asistida por marcadores moleculares del alelo mutante *mtl* del gen *MTL* en plantas segregantes de la población F1 *ind*, derivada del cruzamiento de M741H con un híbrido adaptado a las condiciones ambientales de Pergamino, provincia de Buenos Aires.
- Evaluar caracteres agronómicos en la línea M741H y en la población F1 *ind* a fin de determinar la existencia de mejora en los mismos.

- Generar líneas haploides duplicadas (HD) de maíz a partir del cruzamiento de la línea inductora M741H con tres híbridos experimentales del programa de mejoramiento de INTA, y poner a punto una herramienta genotípica que permita diferenciar individuos haploides de diploides.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación de alelos del gen Matrilineal (*MTL*) y relación con la capacidad de inducción de la línea M741H

Material Vegetal

El germoplasma de maíz incluyó la línea M741H (HIR teórico 2,2 %) derivada de una población inductora Stock6, provista al INTA por el *Maize Genetics Cooperation Stock Center*; la línea B73 *liguleless* y la población F1*ind* resultante del cruzamiento de M741H y el híbrido experimental LP29xLP4703-1.

Diseño de *primers*

En base a la información de secuencias de los alelos del gen Matrilineal publicadas (Kelliher *et al.*, 2017; www.maizegdb.org) se diseñaron cuatro pares de *primers* específicos para la detección de los alelos salvaje (*MTL*) y mutante (*mtl*) utilizando la herramienta informática Primer-Blast disponible online (Imagen 8), en el sitio web del NCBI (National Center for Biotechnology Information <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

El diseño de los *primers* correspondientes a los alelos salvaje y mutante del gen *MTL* se basaron en que el alelo mutante stock 6 (ST6) presenta una variación genética que se manifiesta como una inserción de 4 nucleótidos (CGAG) en el gen (Imagen 6). En contraste, el alelo B73 carece de esta inserción.

>ST6 SECUENCIA

```
AGTTCATCACTAATCACACTTATTGTGCCCTCGACGAGTATCTAGCTAGCTCATAATCGATCAATCGGGGTGTGCGGT  
CGAAGGCGGCAATGGCGAGCTACTCGTCGCGGCGTCCATGCAATACCTGTAGCACGAAGGCGATGGCCGGGAGC  
GTGGTCGGCGAGCCCCTGCTGCTGGGGCAGAGGGTGACGGTGCTGACGGTGGACGGCGGCGGCGTCCGGGGT  
CTCATCCCGGGAACCATCCTCGCCTTCTGAGAGCCAGGCTGCAGGAGCTGGACGGACCGGAGGCGAGGCTGGC  
GGACTACTTCGACTACATCGCCGGAACCAGCACCCGGCGTCTCATCACCGCCATGCTCACCGCGCCCGGCAAGGA  
CAAGCGGCCTCTCTACGCTGCCAAGGACATCAACTACTTTTACATGGAGAAGTACCGGCAAGTGCATGCGCAGCCTGATTAGGA  
GCAGGCTTGGCGCCGATGTCGCGCTGAGGAAGCCAAAGTACAACGGCAAGTGCATGCGCAGCCTGATTAGGA  
GCATCCTCGGCGAGACGAGGGCCAAGAGCACGCTCTGAAGAACGCGCTGCTCTCGGACGTGTGCATTGGCAGC  
TCCGCCGCGCCGACCTACCTCCCGGCGCACTACTTCCAGACTGAAGACGCCAACGGCAAGGAGCGGAATACAAC  
CTCATCGACGGCGGTGTGGCGGCCAACACCCGACGATGGTTGCGATGACGCAGATCACAAAAAGATGCTTGCC  
AGCAAGGACAAGGCCGAGGAGCTGTACCCAGTGAACCCGTCGAACTGCCGAGGTTCTGGTGCTGTCCATCGG  
GACGGGGTGCAGTCCGAGCAGGGCCTCTACACGGCGCGGCAAGTGCATCCCGGTGGGGCATCTGCCGGTGGCTC  
CGCAACAACGGCATGGCCCCATCATCGACATCTTCATGGCGGCCAGCTCGGACCTGGTGGACATCCACGTCGCC  
GCGATGTTCCAGTCGCTCCACAGCGACGGCGACTACCTACGCATCCAGGACAACCTCGTCCGTGGCGCCGCGGCA  
ACCGTGGACGCGGCGACGCCGAGAACATGCGGACGCTCGTCGGGATCGGGGAGCGGATGCTGGCACAGCGGG  
TGCCAGGGTCAACGTGGAGACAGGGAGCGAGGTACGAACCGGTGACCGGAGAAGGAAGCAATGCCGATGCC  
CTCGGTGGGCTCGCTAGGCAGCTCTCCGAGGAGAGGAGAACAAGGCTCGCGCGCCGCGTCTCTGCCATCAACC  
CAGAAGCTCTAGATGTGCGCCCTACGATATCTAAGACAAGTGGCTTTACTGTCAATCACATGCTTGAAATAAGTAGA  
CTTTATTAATAAAATATAAAATATATATAT
```

Imagen 6: Secuencia del alelo mutante del gen matrilineal (ST6). En rojo se detalla la inserción de 4 pb respecto al alelo salvaje. Secuencia tomada de MaizGDB.

Entre los *primers* diseñados, el par de *primers* ST6F (TGGCGGCCCAAGG) y ST6R (TGCAATCGGGCGACATACAT) permite amplificar de manera exclusiva un fragmento de 54 nucleótidos en la región correspondiente al alelo ST6. Por otro lado, el par de *primers* MTLB73F (CGACGGCCGACTACCTACG) y MTLB73R (CCGCGTCCACGGTTG) amplifica un fragmento de 67 nucleótidos específicamente en el alelo B73. Es importante destacar que estos pares de *primers* pueden potencialmente combinarse en una misma reacción multiplex, lo que facilita la identificación de homocigotas y heterocigotas entre los alelos ST6 y B73 en una sola reacción de amplificación. Además, se han desarrollado otros pares de *primers*, TALF (GAGAACATGCGGACGCTCGTC) y TALR (GTTGATGGCAGAGACGCGGC), que generan amplicones de 192 nucleótidos en el alelo B73 y 196 nucleótidos en el alelo ST6. Del mismo modo, los *primers* MTL70F (GGGTGTCCAGGGTCAACG) y MTL70R (GCATCGGCATTGCTTCCTT)

amplifican fragmentos de 70 nucleótidos en B73 y 74 nucleótidos en ST6, respectivamente (Imagen 7).

TGCCGCAGGTTCTGGTGCTGTCCATCGGGACGGGGTGCAGCTCCGAGC
 AGGGCCTCTACACGGCGCGGCAGTGCTCCCGGTGGGGCATCTGCCGGTG
 GCTCCGCAACAACGGCATGGCCCCATCATCGACATCTTCATGGCGGCCA
 GCTCGGACCTGGTGGACATCCACGTCGCCGCGATGTTCCAGTCGCTCCAC
 AGCGACGGGACTACCTACGCATCCAGGACAACCTCGCTCCGTGGCGCCG
 CGGCAACCGTGGACGCGGGACGCCGGAGAACATGCGGACGCTCGTCG
 GGATCGGGGAGCGGATGCTGGCACAGCGGGTGTCCAGGGTCAACGTGGA
 GACAGGGAG**CGAG**GTACGAACCGGTGACCGGAGAAGGAAGCAATGCC
 GATGCCCTCGGTGGGCTCGCTAGGCAGCTCTCCGAGGAGAGGAGAACAA
 GGCTCGCGCGCCGCTCTGCCATCAACCCAGAAGCTCTAGATGTGCG
 CCCTACGATATCTAAGACAAGTGGCTTTACTGTCAATCACATGCTTGTAATA
 AGTAGACTTTATTTAATAAAATATAAAATATATAT

Imagen 7: Fragmento de secuencia del alelo mutante del gen matrilineal. En rojo se marca la inserción de 4 pares de bases (CGAG). Las flechas de diferentes colores indican la posición de cada uno de los *primers* usados en el estudio: en celeste se detalla el par de *primers* Tal; en amarillo se detalla el par de *primers* MTLB73; en naranja el par de *primers* MTL70 y en rojo el par de *primers* ST6.

Par de primers ST6									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGCCGCCCAAGG	Plus	15	1069	1083	59.07	73.33	5.00	0.00
Reverse primer	TGCAATCGGGCGACATACAT	Minus	20	1122	1103	60.18	50.00	4.00	2.00
Product length 54									
Par de primers MTL70									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGGTGCCAGGGTCAACG	Plus	18	1541	1558	59.97	66.67	4.00	2.00
Reverse primer	GCATCGGCATTGCTTCCTT	Minus	19	1610	1592	59.19	52.63	5.00	0.00
Product length 70									
Par de primers TAL									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GAGAACATGCGGACGCTCGTC	Plus	21	1492	1512	63.90	61.90	6.00	6.00
Reverse primer	GTTGATGGCAGAGACGCGGC	Minus	20	1683	1664	64.36	65.00	4.00	4.00
Product length 192									
Par de primers MTLB73									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CGACGGCGACTACCTACG	Plus	18	1003	1020	59.68	66.67	4.00	2.00
Reverse primer	CCGCTCCACGGTTG	Minus	15	1067	1053	57.80	73.33	4.00	3.00
Product length 65									

Imagen 8: Especificaciones de los *primers* diseñados utilizando la herramienta Primer Blast del NCBI. Imagen tomada y adaptada de dicha herramienta. Referencias de la imagen *sequence*

(secuencia), *template strand* (hebra molde), *length* (largo), *start* (comienzo), *stop* (finalización), T_m (Temperatura de Melting), *self complementary* (autocomplementariedad), *self 3 complementarity* (autocomplementariedad del extremo 3), *forward primer* (primer sentido), *reverse primer* (primer anti sentido), *product length* (largo del producto de amplificación), *plus* (hebra positiva), *minus* (hebra negativa) y GM% (porcentaje de Guanina y Citocina).

Extracción de ADN

Se tomaron muestras foliares de plantas individuales, sembradas a campo en estado V2/V3 (con dos a tres hojas totalmente desplegadas según la escala de Ritchie y Hanway (1984)) y de plantas individuales trasplantadas a sombráculo (ver más adelante) en estadio V5/V6 (con cinco o seis hojas totalmente desplegadas según la escala mencionada anteriormente), utilizando un microtubo de 1,5 mil litros como sacabocado y se transportaron en frío hasta el laboratorio. A partir de cada muestra se extrajo el ADN mediante un protocolo con CTAB (Doyle & Doyle, 1987) modificado. La muestra vegetal se trituró con nitrógeno líquido en un microtubo de 1,5 mil litros. Después se alícuotaron 400 μ l de buffer de extracción (CTAB 2X) y se dejaron los tubos en baño termostático a 60 °C. Luego se centrifugaron los tubos y se traspasaron 300 μ l del sobrenadante a un nuevo microtubo de 1,5 mil litros. Se precipitó el ADN con 300 μ l de isopropanol, y luego de una centrifugación, se lavó el precipitado con 100 μ l de etanol 70 %. Por último, se resuspendió el ADN con 100 μ l de Buffer TE 1X. La cuantificación del ADN se realizó mediante un gel de agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio que se observó bajo luz ultravioleta, en comparación visual con patrones del marcador *Lambda DNA Hind III* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

Genotipado de plantas mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las amplificaciones de los alelos del gen *MTL* se realizaron con un termociclador Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler en volúmenes de reacción de 13 μ l, usando 10 μ l de una mix de PCR (buffer taq 10X, $MgCl_2$ 50mM y dNTPs), 0,5 μ l de cada primer (10 mM), 1 μ l de ADN molde, y 1 μ l de Taq Polimerasa (Pegasus-DSBIO). El programa de PCR tuvo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94 °C por 10 minutos, seguida por 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 40

segundos a la temperatura de *Melting* (T_m) requerida por cada par de *primer* (imagen 8) y 30 segundos a 72 °C. Por último, una extensión final a 72 °C por 10 minutos. Las amplificaciones se resolvieron en geles de poliacrilamida 1 % teñido con nitrato de plata. Como parámetro del tamaño de los fragmentos se utilizó un marcador de 100 pares de bases (BMA). Las muestras se sembraron junto con el buffer de siembra DNA Bio-Red (xilencianol, formamida y EDTA).

Se realizaron análisis preliminares para verificar las diferencias en el tamaño de bandas a partir de DNA extraído de individuos de M741H y de B73*liguleless*. Se probó la correcta amplificación por PCR de los *primers* diseñados y se determinó el tiempo de electroforesis requerido por cada par de *primers*. Una vez verificado el funcionamiento de la técnica molecular, se realizó el mismo análisis en individuos de la población F1*ind* y de la línea inductora M741H, tomando muestras en estado V2/V3 de los materiales sembrados en el campo experimental. Si bien todos los pares de *primers* diseñados fueron exitosos, se decidió realizar el genotipado con el par MTL70 ya que permitió determinar la cigocidad de los individuos (ver en “Resultados”).

Evaluación de la capacidad de inducción por cruzamientos de prueba

La línea M741H se sembró en surcos de 5 metros a una densidad de 5 plantas por metro y una distancia de 0,7 metros entre surcos. Se sembraron 40 surcos de la población F1*ind*, 8 surcos de la línea inductora M741H y 4 surcos de la línea B73*liguleless* en el campo experimental de Pergamino de la Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales (ECANA), Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires. A partir de los datos genotípicos obtenidos, se cruzaron individuos de diferente constitución alélica para el gen MTL como progenitores masculinos, con la línea B73*liguleless* como progenitor femenino, para analizar su capacidad de inducción. Cada uno de los tres genotipos (homocigota MTL/MTL; heterocigota MTL/mtl y homocigota mtl/mtl) fue cruzado por 30 plantas de B73*liguleless*. Para realizar los cruzamientos, se cubrieron los primordios florales femeninos con sobres de papel transparente antes de la

aparición de estigmas. Luego, los sobres fueron retirados por un breve momento para polinizar los estigmas emergidos con polen específico y se cubrió la espiga con una bolsa de papel madera con un rótulo identificador hasta cosecha. Se identificaron de cada espiga *B73liguleless* las semillas haploides por expresión diferencial de color para hacer una primera evaluación aproximada de la capacidad de inducción y luego se sembraron todas las semillas en arena, en una cámara de crecimiento a temperatura y fotoperíodo controlados (25 °C, 16 hs de luz). En estado de plántula V2/V3, se evaluó la presencia o ausencia de lígulas para determinar la capacidad de inducción de haploidía (HIR) de los diferentes genotipos de M741H.

Evaluación de caracteres agronómicos de M741H y F1*ind*

La línea M741H de la cual se sembraron semillas y la población F1*ind* de la cual se sembraron semillas, se sembraron a campo con la misma metodología indicada anteriormente. En base al genotipado, se seleccionaron 119 individuos de la población F1*ind* heterocigotas para *MTL* e 84 individuos de la línea inductora M741H homocigotas *mtl/mtl*, que fueron evaluados en características agronómicas de interés: diámetro del tallo (cm); número de hojas a espiga; número de hojas total; altura de inserción de espiga (cm); altura de hoja bandera (cm); altura de planta (cm); largo de hoja espiga (cm); ancho de hoja espiga (cm); largo hoja bandera (cm); ancho de hoja bandera (cm); días a floración femenina desde la siembra.

Obtención de líneas haploides duplicadas (HD) derivadas del cruzamiento de la línea inductora M741H con tres híbridos experimentales

Material Vegetal

Se utilizó la línea M741H y las semillas de procedentes del cruzamiento de la línea M741H y tres híbridos experimentales del programa de mejoramiento genético de la EEA INTA Pergamino: LP662xLP179 (Flint), LP2542xLP3830 (Dentado) y LP3830xLP662 (Semi-dent).

Siembra y germinación bajo condiciones controladas de laboratorio

Se lavaron las semillas procedentes del cruzamiento de los híbridos (LP662XLP179, LP2542XLP3830 y LP3830xLP662) y la línea inductora M741H con agua clorada (1 %) para eliminar patógenos superficiales y luego se realizó un triple lavado con agua destilada para eliminar el cloro. Se sembraron en bandejas (40 semillas por bandeja) con arena estéril humedecida a razón de 100 cm³ de agua por 1 kg de arena, se las cerró con una bolsa de nylon transparente para que conserven la humedad, y se las colocó en cámara de germinación a 25 °C con fotoperíodo de 16 hs de luz y 8 hs de oscuridad hasta estado V2/V3.

Duplicación cromosómica

Las plántulas V2/V3 se sumergieron durante 6 horas, en ausencia de luz, y a una temperatura de 25 °C en solución de colchicina (1 %). Luego, se retiraron de la solución y se les realizó un lavado con agua clorada (0,1 %), y un triple lavado con agua destilada. Luego se transportaron en recipiente con agua a un invernáculo. Tanto los restos de colchicina como el líquido producto del triple lavado se vertieron en bidones para descartes de desechos especiales.

Manejo de las líneas HD

Las plántulas procedentes del cruzamiento de la línea M741H y tres híbridos experimentales del programa de mejoramiento genético de la EEA INTA Pergamino: LP662xLP179 (Flint), LP2542xLP3830 (Dentado) y LP3830xLP662 (Semi-dent) en estadio V2/V3 se colocaron en un invernáculo de alta tecnología (control de temperatura y radiación) en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) de Pergamino del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Se trasplantaron a macetas individuales con un sustrato de arena, vermiculita y tierra en relación 1/1/3 y luego se mantuvieron en el invernáculo donde se realizaron cuidados de riego y fertilización por el transcurso de 15 días. Cuando llegaron a estadio V5/V6 fueron trasladadas a un sombráculo (75 % luz).

Marcadores geno-fenotípicos

Para la selección de las plantas haploides se utilizaron marcadores fenotípicos: las plantas diploides expresaron coloración por antocianinas y eran de mayor porte. No obstante, dado que la expresión de la coloración por antocianinas puede estar inhibida, se probó una herramienta genotípica que permita diferenciar individuos haploides de diploides. Para esto se realizó extracción de ADN y una PCR siguiendo los mismos protocolos detallados previamente, pero utilizando los cebadores de seis marcadores moleculares SSRs: bnlg1217, phi056, bnlg1367, bnlg1070, phi065 y bnlg 1270 (Olmos *et al.*, 2014). Luego se determinó peso en pares de bases de las bandas de cada marcador en las distintas líneas que dieron origen a los híbridos, comparándolos con la línea M741H. A partir de estos resultados se determinó la especificidad en la detección de plántulas haploides por el marcador fenotípico y el marcador molecular de la siguiente manera (Altuntas *et al.*, 2019):

$$\text{Especificidad de la prueba} = \frac{VN}{VN+FP}$$

Siendo:

VN: verdaderos negativos, son diploides y la prueba los detecta como diploides

FP: falsos positivos, son diploides y la prueba los detecta como haploides

Análisis estadístico

Para estudiar la relación entre la tasa de inducción de haploidía (HIR) y la cigocidad de los genotipos evaluados para el gen MTL, se realizó un análisis Regresión Lineal Simple utilizando el método de mínimos cuadrados mediante el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2020). El modelo fue $Y = \beta_0 + \beta_1 X + \varepsilon$, en el que, Y es HIR, X es el genotipo (mtl/mtl, MTL/mtl, MTL/MTL), β_0 es la ordenada al origen, β_1 es la pendiente de la recta de regresión y ε es el error. Una pendiente de la recta de regresión significativamente distinta de cero ($\alpha=0,05$) indica una

asociación entre los alelos de MTL y la tasa de inducción. Por otra parte, se realizó un Análisis de la Varianza (ANOVA) para conocer cuánto de la variación de los datos es explicada por la regresión, y se calculó el coeficiente de determinación R^2 que relaciona la variación explicada por el modelo con la variación total.

Para comparar la línea M741H con la población F1 *ind* a la cual le dio origen en cuanto a sus caracteres agronómicos, se realizó la prueba T para muestras independientes considerando un α de 0,05.

RESULTADOS

Puesta a punto de una herramienta molecular para identificar alelos mutantes del gen Matrilineal (MTL)

La corrida de geles de agarosa verificó la presencia de ADN en todas las muestras extraídas. Se corroboró en el transiluminador que todas las extracciones presentaron ADN de buena calidad (Imagen 9).

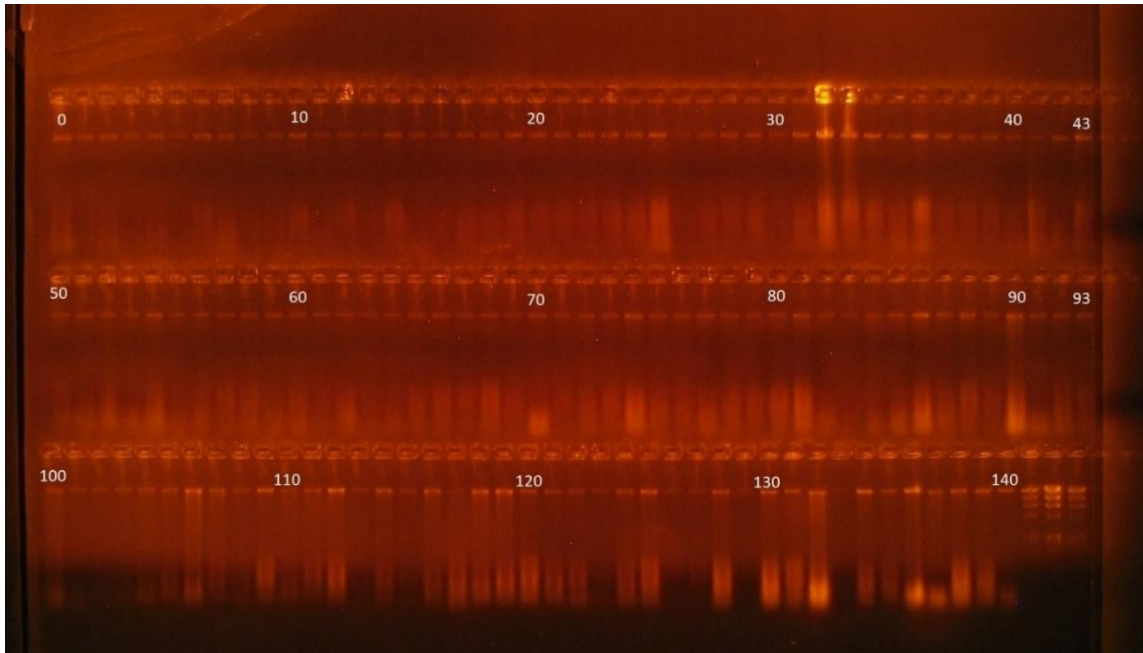


Imagen 9: Visualización del ADN de los individuos de la población F1*ind* en gel de agarosa observado en un transiluminador UV. Los números en la foto son rotuladores de individuos de la población.

Los análisis preliminares con ADN de individuos de M741H y de B73*liguleless* indicaron la correcta amplificación de los *primers* diseñados y se determinó el tiempo de electroforesis requerido por cada par de *primers*. Se realizaron dos *bulks* de la línea M741H y dos *bulks* de la línea B73 *liguleless*: bulk 1 (Bk1= línea M741H), bulk 2 (Bk2= línea M741H), bulk 3 (B73a) y bulk 4 (B73b). Cada bulk contenía ADN de 10 individuos diferentes pertenecientes a la misma línea. El tiempo de corrida electroforetica para los *primers* en el estudio fueron: el par ST6 requiere 30 minutos; MTLB73 y MTL70 requieren 60 minutos y el par TAL necesita 80 minutos

Si bien todos los pares de *primers* diseñados fueron exitosos, el par MTL70 fue seleccionado para continuar con el trabajo, ya que, como se observa en la imagen 10, permitió determinar cigocidad. Por ejemplo, en los individuos 27 y 33 se observa el alelo correspondiente al alelo salvaje (S) de 70 pares de bases. En otros individuos tales como 21, 23, 24 se observan tres bandas, una correspondiente al alelo salvaje de 70 pares de bases, otra correspondiente al mutante de 74 pares de bases y una banda superior heteroduplex, tratándose de individuos heterocigotas (H). En otros individuos como el 22 y 28 solo se observa el alelo mutante (M) de 74 pares de bases. Además, el tiempo de corrida electroforética de los fragmentos de MTL70 fue menor que el de otros pares de *primers* que también permitían ver cigocidad.

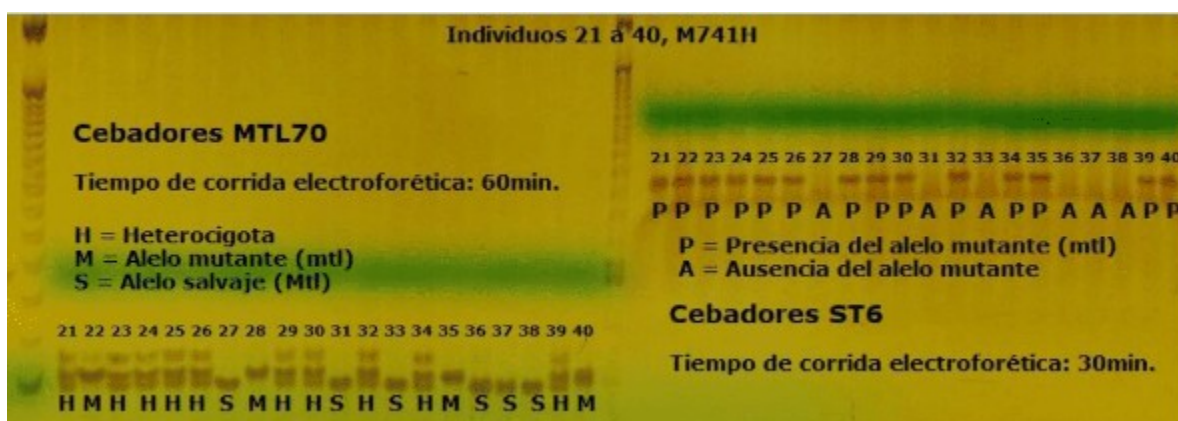


Imagen 10: Evaluación de dos pares de *primers* (MTL70 y ST6) en la línea inductora M741H. Revelado de corrida en gel de poliacrilamida. Se indica el tiempo que tarda cada par (ST6 30 minutos y MTL70 60 minutos). También se observa que ST6 muestra ausencia/presencia y MTL70 permite ver cigocidad.

Con MTL70 se analizaron 941 individuos de la población F1*ind* y 108 de la línea inductora M74H1. Todos los individuos analizados demostraron amplificación para alguno de los dos alelos, ya sea el mutante o el salvaje.

Genotipado de la línea M741H

El genotipado de la línea inductora reveló la presencia de individuos homocigotas para el alelo mutante (*mtl/mtl*), heterocigotas (*MTL/mtl*) y homocigotas para el alelo wild type (*MTL/MTL*).

En base a estos resultados, se realizó la evaluación de la capacidad de inducción (HIR) del M741H realizando cruzamientos de prueba con la línea *B73-ligulaless* mediante la evaluación de la presencia de lígula en la progenie (Imagen 12).

Del cruzamiento de la línea M741H y la línea *B73ligulless* se cosecharon 83 espigas. Se sembró el total de semillas de cada una de las 26 espigas provenientes de la crucea por individuos homocigotas negativos (*MTL/MTL*), 31 heterocigotas (*MTL/mtl*) y 26 homocigotas positivos para el alelo mutante (*mtl/mtl*). Luego se observó si tenían o no lígula, para evaluar la tasa de inducción en cada genotipo del inductor (imagen 11).

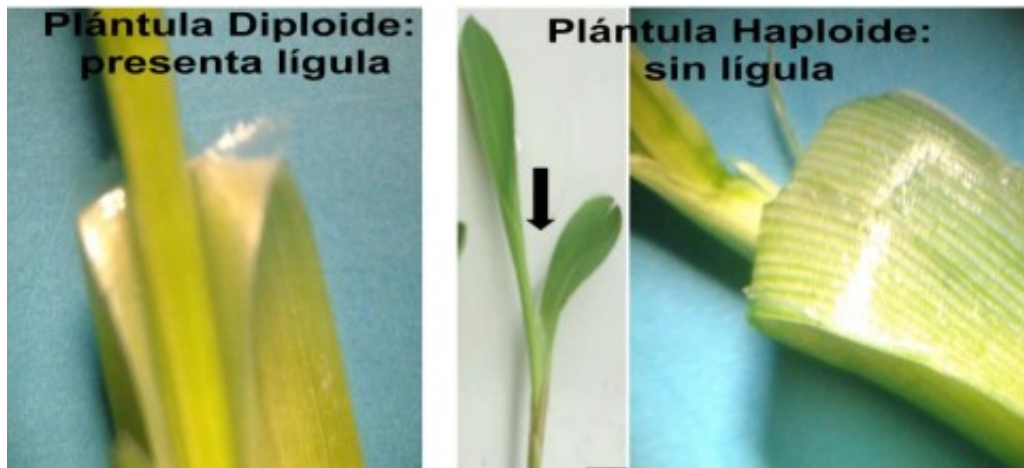


Imagen 11: Progenie de los cruzamientos de prueba entre individuos de la línea inductora y la línea *B73ligulaless*. Foto izquierda: con lígula, planta diploide. Foto derecha: sin lígula, planta haploide. Foto central: ubicación de la lígula en la plántula.

Las plantas homocigotas para el alelo *stock6* (*mtl/mtl*) presentaron una tasa de inducción promedio del 2,19 %, las heterocigotas (*MTL/mtl*) presentaron una tasa del 1,23 %, y las homocigotas para el alelo salvaje (*MTL/MTL*) presentaron una tasa del 0,30 %. Se realizó una *Regresión Lineal Simple* cuyos resultados se indican en la tabla 1 y la imagen 12. El análisis ANOVA indicó que la regresión resultó significativa ($p < 0,0001$).

Estadístico	Estimación	p Valor
R ²	0,8029	
Pendiente β_1	0,9472	<0,0001
Ordenada al origen β_0	0,2924	<0,0001

Tabla 1. Coeficiente de determinación, pendiente, ordenada al origen y valores de probabilidad de la regresión de la tasa de inducción de haploidía (HIR) respecto la cigocidad de los genotipos evaluados para el gen MTL.

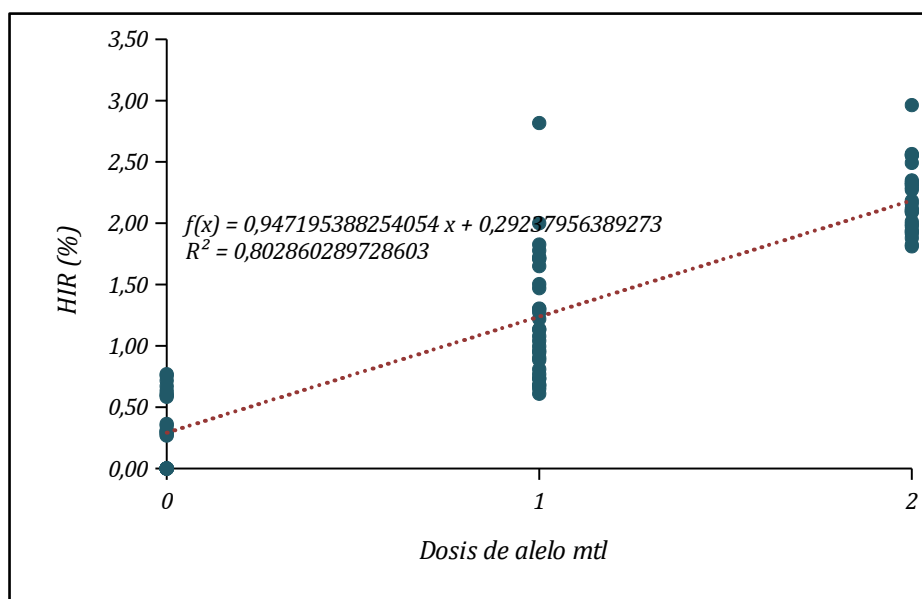


Imagen 12. Gráfico del análisis de regresión entre HIR y las dosis de alelo mutante stock6 (*mtl*). Se indica la ecuación de la recta de regresión y el coeficiente de determinación (R^2). Una dosis de 0 indica que el genotipo fue *MTL/MTL*, una dosis de 1 corresponde a los heterocigotas (*MTL/mtl*) y una dosis de 2 a los individuos *mtl/mtl*.

Selección asistida por el marcador MTL70 en la población F1ind

De 941 las muestras analizadas de la población F1ind, se encontró que 119 individuos fueron heterocigotas, es decir, presentaron tanto el alelo mutante como

el salvaje, y fueron seleccionados. Las restantes 822 solamente presentaron el alelo salvaje del gen MTL y no fueron seleccionadas (Imagen 13). Se recombinaron todas las plantas F1*ind* heterocigotas, mediante *bulk* de polen se polinizaron las plantas heterocigotas de la F1*ind* y se generó una población Syn1 que se analizará en el futuro en busca de individuos homocigotas para el alelo mutante del gen MTL, con los que se formará una población de inducción Syn2 para continuar con el programa de mejoramiento.



Imagen 13: Genotipado del gen MTL con el marcador molecular MTL70, en individuos de la población F1*ind*. Los individuos heterocigotas (H) presentan tres bandas: ≈90pb (heterodúplex), 74pb (alelo mtl) y 70pb (alelo MTL). El resto de los individuos solo presentan la banda de 70pb (alelo MTL).

Evaluación de caracteres agronómicos de la línea M741H y la población F1*ind*

Los individuos seleccionados de la población F1*ind* y los individuos de la línea inductora M741H fueron evaluados en características agronómicas de interés y se compararon los resultados (Tabla 2).

Variable	Promedio F1 <i>ind</i>	Promedio M741H	p Valor	Mejoramiento en % entre F1 <i>ind</i> y M741H
Diámetro del tallo (cm)	2.4	1.4	<0,0001	71

N° de hojas a espiga	10.2	9.2	<0,000 1	10
N° de hojas total	14.6	12.8	<0,000 1	13
Altura de inserción de espiga (cm)	71.7	54.3	<0,000 1	32
Altura hoja bandera (cm)	148.8	104.9	<0,000 1	42
Altura de planta (cm)	181.5	133.0	<0,000 1	36
Largo hoja espiga (cm)	70.3	56.3	<0,000 1	25
Ancho hoja espiga (cm)	7.9	5.5	<0,000 1	45
Largo hoja bandera (cm)	24.9	20.1	0,0175	24
Ancho hoja bandera(cm)	4.0	2.9	<0,000 1	37
% Quebrado y vuelco	4.2	29.9		-86

Tabla 2. Medias de la población mejorada y M741H para los caracteres agronómicos evaluados, valores de significancia estadística según la prueba T y porcentaje de mejora.

Como se muestra en la tabla 2, existieron diferencias entre los materiales para todas las características agropecuarias de interés y se observó una mejora de la población F1*ind* respecto a la línea inductora.

Puesta a punto de una técnica para generar líneas haploides duplicadas (HD) de Maíz

Marcadores geno-fenotípicos

Se encontró que el alelo del marcador SSR bnlg1367 en la línea M741H, puede distinguirse del alelo del resto de las líneas parentales utilizadas como material fuente (Tabla 3). Se observaron diferencias en el peso molecular (kDa), para los diferentes SSR analizados para las diferentes líneas endocriadas en el trabajo, si bien todos los SSR son polimórficos y pueden diferenciar las líneas parentales, el SSR bnlg1367 presenta un patrón de migración que facilita su análisis en una corrida electroforética.

Marcador SSR	BIN	Número de alelos	Línea endocriada					Mínimo	Máximo
			M741 H	LP662	LP2543	LP179	LP3830		
			Peso del marcador (kDa)						
phi056	1,01	6	250	238/250	247	243	256	238	256
bnlg1217	4,05	13	210	198	206	184/229	229	184	229
bnlg1367	7	10	185	129	127	156	125	125	185
bnlg1070	7,03	9	220	23/254	214	238	234	214	254
phi065	9,03	5	138	132	146	146	151	132	151
bnlg1270	9,06	17	170	165/182	162	148	200	148	200

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Tabla 3: Resumen y posicionamiento de la localización molecular de cada uno de los SSRs (MM) en las líneas progenitoras de los híbridos utilizados en el estudio. M741H es la línea inductora, LP662 y LP179 son las líneas que dan origen al fenotipo Flint, LP2542 y LP3830 son las líneas que dan origen al fenotipo tipo Dentado, y LP3830 y LP662 son las líneas que dan origen al fenotipo Semi-dentado. Se marca el marcador que evidencia en mayor medida las diferencias entre líneas.

Del cruzamiento entre la línea inductora M741H y los híbridos LP662xLP179 (Flint), LP2542xLP3830 (Dentado) y LP3830xLP662 (Semi-dent) utilizados en el estudio se cosecharon un total de 130469 semillas, de las cuales se obtuvieron un total de 1624 semillas posibles haploides (H_0), seleccionadas todas a través del marcador de antocianinas, por tres operarios diferentes. En el genotipo Dentado se diferenciaron 794 semillas H_0 en su cruzamiento con el inductor dando un porcentaje de semillas H_0 conseguidas del 1,46 %, en el genotipo Semi-dentado se obtuvieron 540 semillas H_0 (porcentaje 1,10 %), y en el genotipo Flint 190 semillas H_0 (porcentaje 0,70 %). En el genotipo Flint, se cosecharon 60 espigas más que se descartaron por no presentar ningún tipo de pigmentación.

	GENOTIPO		
	DENTADO	SEMIDENT	FLINT
Numero espigas	185	164	127
Numero semillas H_0	794	540	190
Numero semillas totales	54312	49064	27093

% de semillas posibles HD	1,46	1,10	0,70
--------------------------------------	------	------	------

Tabla 4: Semillas posibles haploides (H_0) seleccionadas por los operarios a través de selección fenotípica. En la primera fila se detalla el número de espigas cosechadas para cada fenotipo, en la segunda el número de semillas H_0 , en la tercera el número de semillas totales y en la cuarta el porcentaje de semillas posibles haploides.

Las semillas posibles haploides (H_0), se pusieron a germinar en macetas bajo condiciones controladas en el laboratorio. Durante el proceso de germinación, se distinguieron las plantas haploides de las diploides a través de selección fenotípica, como se observa en la imagen 14, dado que las plantas haploides al tener un genotipo “n” son plantas con menor vigor y además no tienen el marcador de antocianinas en el tallo. De las 1524 semillas posibles haploides, se hallaron 344 plántulas haploides.

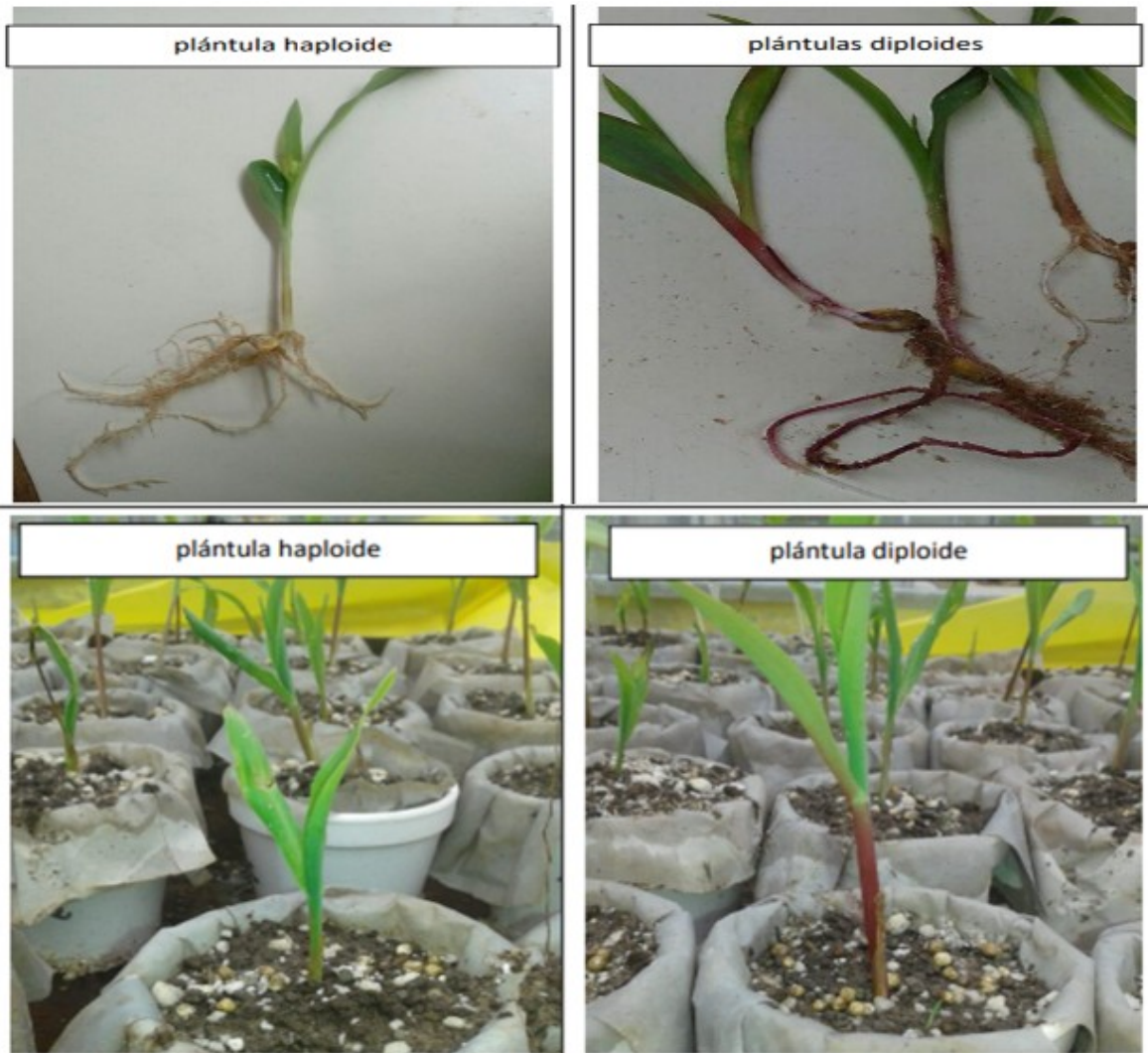


Imagen 14: Diferencias fenotípicas entre las plántulas haploides (H_0) y las diploides. En la parte superior de la imagen se observa a la izquierda una plántula haploide (n) y a la derecha varias plántulas diploides ($2n$). En la parte inferior de la imagen se observan plántulas haploides (izquierda) y diploides (derecha). Las plántulas haploides tienen menor tamaño (menor vigor) que las DI-haploides y carecen de la pigmentación por antocianinas.

Las 344 plántulas consideradas haploides luego de la selección fenotípica, se trataron con colchicina y luego se trasplantaron en macetas individuales, se trasladaron al invernáculo (Imagen 14), y en estadio V5/V6 se tomaron muestras foliares para su análisis molecular con el SSR *bnlg1367* (Imagen 15).

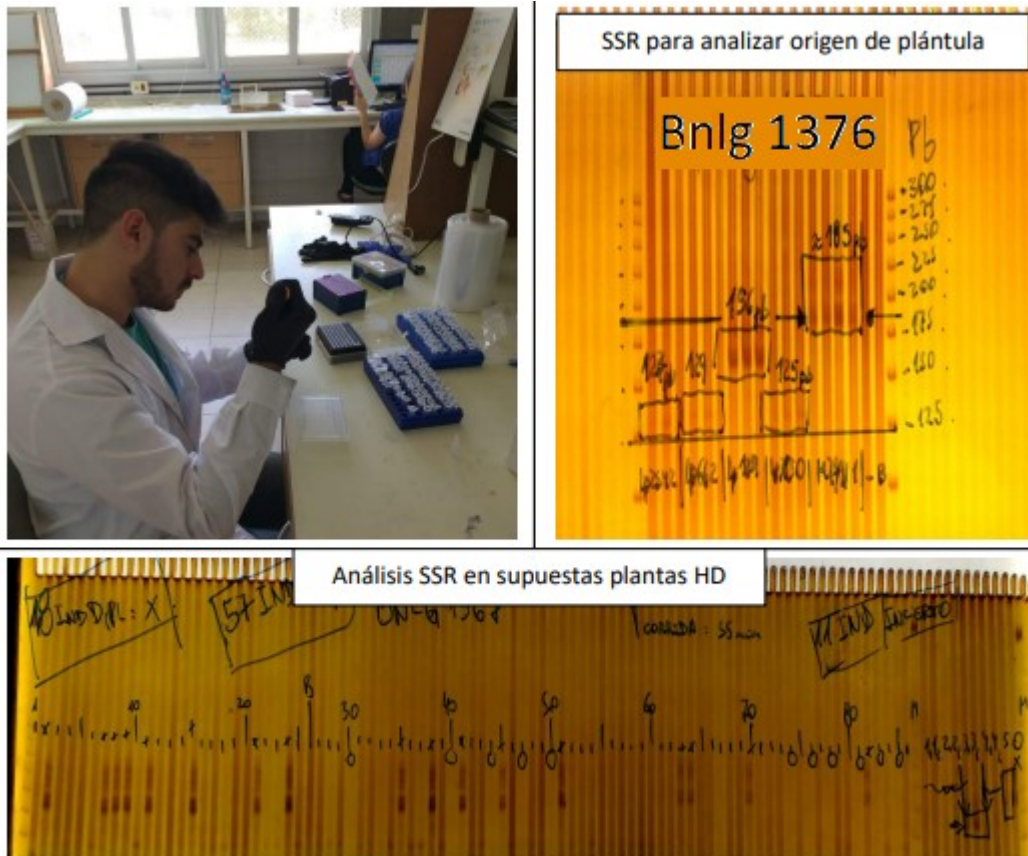


Imagen 15: Revelado de la amplificación del SSR bnlg1367 para las líneas parentales y para la línea M741H inductora de haploidía, el alelo de $\approx 185\text{pb}$ pertenece a la línea inductora, los restantes alelos a las líneas parentales (foto superior derecha). Análisis molecular de las supuestas plantas haploides con el SSRs bnlg1367 (foto inferior). Tesinista realizando PCR foto (superior izquierda).

Se evaluó la coloración por antocianinas de las plántulas consideradas haploides y la presencia del alelo del inductor M741H. Se encontró que 84 de las 344 plántulas posibles haploides poseían la coloración antociánica propias de un diploide y el alelo del inductor, tratándose finalmente de plántulas diploides. Por otra parte, se detectaron 14 plántulas con el marcador de antocianinas, que no lograron amplificar el alelo correspondiente a M741H. Por último, otras 16 plántulas no mostraron coloración por antocianinas, pero resultaron portadoras del alelo correspondiente a M741H.

Debido a los resultados antes indicados, se realizaron los siguientes cálculos, considerando para cada método, al otro como el que detecta a los realmente diploides:

$$\text{Especificidad en la detección por antocianinas} = \frac{84}{84+16} = 0,840$$

$$\text{Especificidad en la detección por bnlg1367} = \frac{84}{84+14} = 0,857$$

Las plántulas que no mostraron coloración antociánica y no presentaron el alelo bnlg1367 correspondiente a M741H, se trasplantaron en un sombráculo y llegada la floración se autopolinizaron (Imagen 16). Cada una de las 88 de las espigas cosechadas se trata de una línea haploide duplicada, 100 % homocigota para todos los genes que quedaron disponibles en la estación experimental de INTA para su utilización



Imagen 16: Plantas posibles haploides tratadas con colchicina después del trasplante al sombráculo (imagen superior). Plantas haploides duplicadas (inferior izquierda). Espigas haploides duplicadas cosechadas (inferior derecha).

DISCUSIÓN

Puesta a punto de una herramienta molecular eficiente y reproducible para identificar alelos mutantes del gen Matrilíneo (MTL)

En el presente trabajo, se observó que existe relación entre la tasa de inducción y la constitución alélica de los individuos de la línea inductora M741H para el gen *MTL*, lo que indicaría que la presencia del alelo mutante del gen es un factor determinante en el aumento de la capacidad de inducción de los individuos de la línea. Sin embargo, se observó que los individuos que no poseen ninguna copia del alelo mutante presentan cierta capacidad de inducción (0,3 %) que es mayor a la que se genera espontáneamente en la naturaleza (0,1 %; Chase, 1951). Esto estaría indicando que existe algún factor además del alelo mutante del gen *MTL* que estaría modificando la capacidad de inducción de estos individuos. De forma reciente, se han realizado diversos análisis de ligamiento y estudios de asociación de todo el genoma en la identificación de loci cuantitativos (QTL) para revelar la arquitectura genética de la inducción de haploidía (HIR). Se identificaron varios QTL relacionados con HIR mediante el uso de poblaciones biparentales, entre los cuales el QTL *qhir1* (Bin 1,04) y el QTL *qhir8* (Bin 9,01) explicaron ~66 % y ~20 % de la varianza genética para HIR, respectivamente (Prigge *et al.*, 2012). Además de estos dos principales QTL responsables de HIR, también se han identificado otros QTL con efectos más débiles, lo que sugiere que la arquitectura genética de HIR es mucho más compleja que solo genes de herencia simple (Li *et al.*, 2021). En otro estudio, se identificó que un cambio de un solo nucleótido en el gen *ZmDMP*, presente en *qhir8*, lleva a un incremento de dos o tres veces de la capacidad de inducción de haploidía (Zhong *et al.*, 2019). Las mutaciones en *ZmDMP* resultaron en la inducción de haploidía con HIR de 0,1 a 0,3 %, y la habilidad de incrementar 5 o 6 veces HIR en presencia de *mtl*, lo que sugirió que más de una vía podría estar involucrada en el alto HIR. Quedaría en propuesta el análisis de este gen en las poblaciones de inducción generadas durante este trabajo, pudiendo seleccionar a los individuos que posean los alelos mutados de ambos genes, lo que lograría un aumento en la capacidad de inducción de las

poblaciones, o integrar los alelos a las poblaciones, si estos no se encuentran presentes.

La frecuencia del alelo mutante del gen *MTL* se encontraba en 0,4 en el material fuente que dio origen a la línea inductora M741H, por lo cual podría esperarse que, con una línea purificada para el alelo, es decir con una frecuencia alélica más cercana a 1, sumada a la acción sinérgica de otros genes como *ZmDMP* se mejore la tasa de inducción de la línea.

Mejoramiento asistido por marcadores moleculares del alelo mutante *mtl* del gen *MTL* en la población *F1ind*

En relación a la población *F1ind*, los resultados del genotipado de los individuos pueden explicarse mediante la aplicación de los principios establecidos por Gregor Mendel en genética, el Principio de la Uniformidad, el Principio de la Segregación de los Caracteres Independientes y la Ley de la Segregación Independiente de Alelos (Pierce, 2009). De acuerdo con estos principios:

- El genotipado de la línea inductora M741H reveló variabilidad genética entre los individuos de la línea. En el material fuente que dio origen a la población inductora inicial, se encontró que la frecuencia alélica del alelo mutante del gen *MTL* era de 0,4. Esto implica que existen individuos de la línea inductora que carecen del alelo mutante, por lo cual hay una desviación en cuanto al 50 % de plantas heterocigotas para alelo mutante del gen *MTL* esperadas en la retrocruza. Esta frecuencia alélica podría deberse a factores genéticos que controlan la inducción de haploidía y que han sufrido alteraciones debido a procesos de segregación. Se ha observado que la naturaleza tiende a seleccionar en contra de los alelos que controlan la inducción de haploidía, como se ha demostrado en investigaciones previas realizadas por Prasanna *et al.* (2013).
- Los individuos heredan un solo alelo del gen *MTL* de cada uno de sus progenitores, lo que implica que *F1ind* solo presentará individuos heterocigotas para el alelo mutante (*MTL/mtl*) y homocigotas para el alelo "wild type" (*MTL/MTL*).

En resumen, los resultados del genotipado en la población *F1ind* son coherentes con las leyes de la genética mendeliana, pero la presencia de variabilidad genética y la influencia de factores genéticos y ambientales que pueden alterar la segregación, explican las diferencias observadas respecto a la proporción esperada de individuos heterocigotas y homocigotas. Estos hallazgos podrían ser relevantes para futuras investigaciones y aplicaciones relacionadas con la haploidía y la genética de la población estudiada.

Evaluación de caracteres agronómicos en la línea M741H y en la población *F1ind*

En este trabajo se observó una mejora en los caracteres agronómicos de la población con capacidad de inducción *F1ind* con respecto al inductor M741H. Esto se debe principalmente a que esta población deriva de un híbrido adaptado a la región de estudio, lo cual hace que esté más adaptada que el inductor. Por ejemplo, *F1ind* presentó un 86 % menos de vuelco y quebrado, y un 71 % más de diámetro del tallo lo cual hace que esté más adaptada a las condiciones edafoclimáticas de nuestra región. Se debe destacar que, durante el desarrollo de este trabajo existió un fuerte temporal, lo cual permitió observar una diferencia marcada entre la población segregante y el inductor: el aumento en el diámetro de tallo y la disminución en el porcentaje de vuelco para la población respecto de la línea inductora confiere una ventaja.

Obtención de líneas haploides duplicadas (HD) derivadas del cruzamiento de la línea inductora M741H con tres híbridos experimentales del programa de mejoramiento de INTA

Se encontró que el SSR *bnlg1367* sería promisorio para confirmar que un individuo con características fenotípicas propias de un haploide, no posea el alelo de la línea M741H, lo cual confirmaría que el uso de marcadores moleculares en la selección de individuos haploides se presenta como una herramienta sumamente eficaz. Esto se debe a su capacidad para simplificar el proceso de selección, como se explica en el trabajo de Álvarez Gil (2011). Esta técnica contribuye a eliminar dos fuentes principales de error en la selección. En primer lugar, evita los errores

humanos que suelen ocurrir cuando los operarios seleccionan visualmente semillas posibles haploides. En segundo lugar, supera los obstáculos relacionados con los inhibidores de pigmentación de antocianinas presentes en el material vegetal fuente. Como se menciona previamente, el HIR teórico de la línea M741H se estima en un 2,2 %. Sin embargo, es evidente que existieron discrepancias entre este valor y las tasas de éxito obtenidas en los cruzamientos con los híbridos y la línea inductora, que fueron del 1,46 % para el germoplasma Dentado, 1,10 % para el Semidentado y 0,70 % para el Flint. Estas discrepancias en la obtención de semillas haploides se atribuyen a la presencia de genes inhibidores de antocianinas tales como *C1-I*, *C2-Idf* e *In1-D* (Prasanna, 2013), presentes en los híbridos utilizados como germoplasma materno y al entrenamiento del operario a la hora de seleccionar las semillas. Si bien la especificidad en la detección de haploides de los dos métodos de selección (pigmentación por antocianinas y uso de marcadores moleculares) es similar, el uso de marcadores facilita el trabajo en el laboratorio, permitiendo un proceso más repetible, eficiente y objetivo. Como se vio en los resultados, entre las plantas consideradas diploides 14 tenían el marcador de pigmentación de antocianinas, pero no lograron amplificar el alelo *bnlg1367* correspondiente a M741H. Si bien esto podría deberse a distintos eventos genéticos como traslocaciones o eliminación parcial de los cromosomas paternos, es probable que estas plantas presenten el alelo, pero no se haya logrado la amplificación debido a la calidad del ADN extraído, ya que, al realizarse una extracción rápida, es probable que este se haya deteriorado con el paso del tiempo. Es por esto, que a partir de lo ocurrido al llevar a cabo este trabajo se recomienda realizar PCR dentro de los 15 días de la extracción de ADN. También hubo 16 plantas que no mostraron coloración por antocianinas, pero eran portadoras del alelo *bnlg1367* correspondiente a M741H, lo que puede explicarse por la posible existencia de algún alelo inhibidor de antocianinas en el material fuente. De no ser por el uso de los marcadores, estas plantas se hubiesen considerado haploides.

El alelo del marcador SSR *bnlg1367* en la línea M741H presenta características distintivas en comparación con los alelos encontrados en las demás líneas

parentales utilizadas como material fuente. Se ha observado que este alelo muestra un alto potencial para diferenciarse del alelo presente en la línea M741H en aproximadamente el 80 % de los materiales más relevantes en el Programa de Mejoramiento de Maíz de la EEA INTA Pergamino, ya que al ser de mayor tamaño es fácilmente reconocible, en comparación con los otros SSRs analizados que tienen un patrón de reconocimiento más complejo. Además de ser útil para eliminar falsos positivos, este marcador también brinda la oportunidad de monitorear la eficiencia en la detección de semillas haploides (H_0) y determinar el grado de eficiencia en la producción de líneas haploides duplicadas.

Actualmente, los primeros pasos en el mejoramiento de la población de inducción se enfocaron en mantener la expresión del marcador R1-nj, en mejorar los caracteres agronómicos y en conservar el alelo mutante del gen MTL. En una segunda etapa se podría poner énfasis en mejorar el HIR para esta población. Para citar un ejemplo, se podrían realizar acuerdos con instituciones tales como el CIMMYT y utilizar sus inductores sub-tropicales para identificar e incorporar a nuestra población alelos asociados a un mayor HIR, como el caso del alelo mutante en el gen ZmDMP que es sabido trabaja en forma sinérgica con el gen MTL (Zhong et al., 2019). Dependiendo del genotipo que se utilice como material fuente, la coloración del endosperma y el embrión pueden variar desde la expresión de un color intenso hasta una leve coloración. Una mayor coloración de los tejidos facilita la distinción de semillas haploides, y una pobre coloración de los tejidos hace mucho más dificultosa la correcta selección de semillas haploides. La velocidad y la eficiencia con que se identifican las semillas haploides dependen de que el personal esté debidamente capacitado para la detección por este método. Se encontró que para los genotipos Flint, algunas espigas mostraron una inhibición total de los genes de antocianinas. Interpretar esta cualidad de que tratándose del mismo genotipo pueda, o no, inhibir totalmente la coloración de antocianinas en el grano, escapa a las pretensiones del presente trabajo, pero sin dudas es un tema interesante para continuar investigando.

Las plantas haploides (n) son estériles, por lo que el objetivo de la duplicación cromosómica es conferirles fertilidad. Las plantas que resulten fértiles ($2n$), son autopolinizadas a fin de producir líneas haploides duplicadas (DH). La duplicación cromosómica espontánea ocurre con poca frecuencia en la naturaleza y depende del genotipo de la población fuente (Prasanna, 2013). Para lograr que la duplicación cromosómica ocurra con alta frecuencia, las plantas haploides son tratadas con químicos llamados inhibidores mitóticos, que dan por resultado una célula con dos veces el número de cromosomas (Chaikam & Mahuku, 2012; Melchinger *et al.*, 2016). La duplicación cromosómica puede no ser efectiva para todos los tejidos y órganos de la planta. Con este método, se puede obtener una tasa de éxito del 10–30%, dependiendo de la población (Chaikam & Mahuku 2012; Melchinger *et al.* 2016), en el presente trabajo se obtuvo una tasa de duplicación cromosómica del 29%, lo cual corresponde a una tasa de éxito muy buena. Sin embargo, la colchicina es tóxica y debe manejarse y desecharse con cuidado. Por lo tanto, es deseable reemplazar la colchicina con alternativas menos tóxicas en los protocolos de duplicación cromosómica (Chaikam & Mahuku, 2012). Se han optimizado procesos de duplicación cromosómica basados en herbicidas antimitóticos y gas óxido nitroso (N_2O) (Chaikam *et al.*, 2019).

Otra alternativa a la duplicación cromosómica inducida químicamente es depender de la duplicación cromosómica y la restauración espontánea de la fertilidad haploide, donde las plantas haploides producen polen y semillas sin tratamiento químico. La tasa de duplicación cromosómica espontánea se puede calcular como la proporción de plantas fértiles que dan semillas después de la autopolinización entre todas las plantas haploides (Kleiber *et al.*, 2012), y este valor es similar a la tasa de éxito para la duplicación cromosómica artificial. En la mayoría del germoplasma de maíz, la tasa de duplicación cromosómica espontánea es demasiado baja para la producción de haploides duplicados (Kleiber *et al.*, 2012). Sin embargo, estudios recientes indican una enorme variación genética y una alta heredabilidad para la duplicación espontánea y la restauración de la fertilidad, lo que hace que la mejora mediante selección sea prometedora (Kleiber *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2017a; Wu *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2018). Estudios realizados en el

CIMMYT (Centro de Investigación y Mejoramiento de Maiz y Trigo) de restauración espontánea de la fertilidad en haploides derivados de 330 líneas endogámicas tropicales reveló una variación genética sustancial y una alta heredabilidad para los rasgos de fertilidad haploide (Chaikam *et al.*, 2019). Algunas de estas líneas endogámicas tropicales han mostrado una capacidad extraordinaria para la duplicación cromosómica espontánea y tienen tasas de restauración de fertilidad superiores a las tasas de éxito logradas mediante la duplicación cromosómica artificial.

La optimización de estos protocolos de duplicación cromosómica basados en productos químicos no peligrosos y duplicación cromosómica espontánea, es otra área de investigación que podría aumentar aún más la eficiencia general de la producción líneas haploides duplicadas (Chaikam *et al.*, 2019).

CONCLUSIONES

La presencia del alelo mutante del gen *MTL* resultó determinante para el aumento de la capacidad de inducción de los genotipos inductores; la presencia de un alelo mutante dio un aumento significativo en la capacidad de inducción y la presencia de dos alelos mutantes, un aumento aún mayor. Sin embargo, se demostró que individuos de la línea inductora M741H que carecían del alelo mutante tenían un porcentaje de semilla haploide encontrado más alto de lo que ocurre en la naturaleza y que esto se debería a la presencia de otros genes que actúan en forma sinérgica con *MTL*, tal como *ZmDMP*. Por esto, podría continuarse este trabajo mediante la búsqueda de los alelos de estos genes en germoplasma propio o en germoplasma exótico, por ejemplo los inductores tropicales, subtropicales desarrollados por el CIMMYT, para su incorporación a nuestra población *Syn1* a través del uso de marcadores moleculares. Como se demostró en este trabajo, el uso de marcadores es una herramienta eficiente para la selección de los individuos portadores de alelos de interés.

En cuanto al marcador *bnlg1367*, fue de utilidad para lograr la distinción entre plántulas haploides y diploides. Si bien sería un marcador muy eficiente para lograr distinguir plántulas haploides de diploides, puesto que disminuiría el error humano eliminando tanto los falsos positivos como los negativos, no es una herramienta viable para su utilización en la técnica de obtención de haploides duplicados. Si fuese práctica y económicamente viable el uso de marcadores moleculares se evitaría la selección fenotípica de coloración por antocianinas y también la de marcadores bioquímicos (alto contenido de aceite en grano) para la selección de semillas haploides.

La población *F1ind* presentó un fenotipo agronómicamente deseable como consecuencia de una mejor adaptación al ambiente, por lo que se espera que esta población mejorada sea más resistente al quebrado y vuelco tenga una mayor productividad, panojas más grandes, más polen y su liberación se produzca durante más cantidad de tiempo, entre otras características; convirtiéndola en un potencial mejor inductor que la línea parental de base.

Si bien la extracción de ADN rápida utilizada fue exitosa para el estudio, se propone como punto de mejora optimizarla para que el ADN almacenado no se degrade tan rápido. La lógica de esta extracción es que necesitamos procesar un alto número de muestras en un período corto de tiempo, desde V2 hasta floración, porque tenemos que decidir qué hacer con cada individuo. El punto de mejora sería mejorar la extracción rápida, para que, una vez seleccionadas los individuos por alelos puntuales de interés, ese ADN pueda servir para seguir estudiando la presencia de otros alelos de interés (con marcadores que primero hay que poner a punto).

Se espera encontrar en la población Syn1 obtenida individuos homocigotas para el alelo mutante del gen *MTL*. Esta población podrá ser analizada con la herramienta molecular utilizada en este estudio.

Como conclusión final se destaca el desarrollo con éxito de una herramienta molecular eficiente y reproducible para identificar los alelos mutantes del gen *MTL*. Esto representa un avance significativo para el programa de mejoramiento de maíz de INTA, incentivando a continuar con la utilización de MAS para éste y otros caracteres de interés. Por otra parte, se encontró otra herramienta molecular que en principio permitiría identificar individuos falsos H_0 en estadios tempranos del desarrollo y de manera más precisa que el marcador fenotípico (coloración por antocianinas en la semilla), lo que permite un trabajo práctico y sencillo dentro del laboratorio para obtener datos de eficiencia de trabajo de los operadores, como su tasa de aciertos en la selección de semillas H_0 , etc; pero que no es viable para utilizar en una técnica aplicada a la obtención de líneas haploides duplicadas.

El mejoramiento realizado sobre esta línea inductora es sin duda el primer puntapié en el objetivo de adaptar al ambiente local inductores de haploidía, con el potencial de ser utilizado tanto dentro del INTA para su propio programa de mejoramiento o para realizar servicios a terceros, como para ser utilizado por las pequeñas y medianas empresas que carecen de la capacidad económica para abastecerse con líneas inductoras *elite* para sus proyectos de producción e investigación.

BIBLIOGRAFIA

- Agritotal. (2023, 11 de septiembre). Con el menor volumen en 8 años, finalizó la cosecha de maíz 2022/2023. <https://www.agritotal.com/nota/la-cosecha-de-maiz-finalizo-en-34-millones-de-toneladas-la-peor-cosecha-en-ocho-anos/>
- Aldrich, S.R, Leng E.R (1974). Producción moderna del Maíz. J. Knoop Ed. Editorial Hemisferio Sur. 307pp.
- Altuntaş, Y., Cömert, Z., & Kocamaz, A. F. (2019). Identification of haploid and diploid maize seeds using convolutional neural networks and a transfer learning approach. *Computers and Electronics in Agriculture*, 163, 104874.
- Álvarez Gil, M. (2011). La selección asistida por marcadores (MAS, «Marker-Assisted Selection») en el mejoramiento genético del tomate (*Solanum lycopersicum L.*). *Cultivos Tropicales*, 32(3), 46-58.
- Andrade, F. H., 1995. Analysis of growth and yield of maize, sunflower and soybean grown at Balcarce, Argentina. *Field Crops Res.* 41, 1-12.
- Barret, P., Brinkmann, M., & Beckert, M. (2008). A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for in situ gynogenesis in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 117, 581–594.
- Bilello, G., Puppi, N., & González, M. (2009). La nueva Ganadería. Cambios en la actividad a partir de la expansión agrícola. Relocalización e intensificación productiva. Un estudio comparativo en dos provincias argentinas. *Revista interdisciplinaria de Estudios Agrarios N°31*.
- Boch, J., et al. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326, 1509–1512.

- Boerman, N. A., Frei, U. K., & Lübberstedt, T. (2020). Impact of spontaneous haploid genome doubling in maize breeding. *Plants*, 9(3), 369.
- Chaikam, V., Mahuku, G., & Prasanna, B. M. (2012). Design and implementation of maternal haploid induction. En B. M. Prasanna, V. Chaikam y G. Mahuku (Eds.), *Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice* (pp. 14–19). CIMMYT.
- Chaikam, V., Nair, S. K., Babu, R., Martinez, L., Tejomurtula, J., & Boddupalli, P. M. (2015). Analysis of effectiveness of R1-nj anthocyanin marker for in vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of R1-nj expression. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 128(1), 159–171.
- Chaikam, V., Nair, S. K., Martinez, L., Lopez, L. A., Utz, H. F., Melchinger, A. E., & Boddupalli, P. M. (2018). Marker-Assisted Breeding of Improved Maternal Haploid Inducers in Maize for the Tropical/Subtropical Regions. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1527.
- Chaikam, V., Molenaar, W., Melchinger, A. E., et al. (2019). Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(11), 3227–3243. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03433-x>
- Chase, S. S. (1947). Techniques for isolating monoploid maize plants. *J. Bot.* 34: 582.
- Chase, S. S. (1951). Production of homozygous diploids of maize from monoploids. *Agron. J.* 44, 263–267.
- Chase, S. S. (1952). *Monoploids in maize*. Iowa State College Press, Ames, Iowa, pp. 389–399.
- Chase, S. S. (1969). Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.). *Bot Rev* 35, 117–168.
- Chase, S. S., Nanda D.K. (1965). Screening for monoploids of maize by us of a purple embryo marker. *Maize Gen Coop Newslett* 39, 59–60.

- Coe, E. H. (1959). A Line of Maize with High Haploid Frequency. *The American Naturalist* 93(873, 381-382).
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- Eder J., Chalyk S. (2002) In vivo haploid induction in maize *Theor. Appl. Genet.* 104, 703–708.
- Forster, B. P., & Thomas, W. T. B. (2005). Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breed Review*, 25, 57-88.
- Geiger, H. H. & Gordillo, G. A. (2009). Doubled Haploids. In *Handbook of Maize*. Springer New York, pp 641-657.
- Gilles, L. M., Martinant, J. P., Rogowsky, P. M., & Widiez, T. (2017). Haploid induction in plants. *Current Biology*, 27, R1089-R1107.
- Gilles, L. M., Khaled, A., Laffaire, J. B., Chaignon, S., Gendrot, G., Laplaige, J., Bergès, H., Beydon, G., Bayle, V., Barret, P., Comadran, J., Martinant, J. P., Rogowsky, P. M., & Widiez, T. (2017). Loss of pollen-specific phospholipase NOT LIKE DAD triggers gynogenesis in maize. *The EMBO journal*, 36(6), 707–717.
- Golik, S. I., Larran, S., Gerard, G. S., Fleitas, M. C., & Golik, S. I. (2018). Maíz: Importancia, origen, sistemática, morfología y composición química (pp. 10-32). Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.
- Gupta, M. (2022). Doubled Haploid Technology in Maize (*Zea mays*): Status and Applications. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 92(3), Rev Art 283-291.

- Greenblatt, I. M., & Bock, M. (1967). A commercially desirable procedure for detection of monoploids in maize. *The Journal of Heredity*, 58(1), 9–13.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC). (2018). El futuro de las raíces. Censo Nacional Agripecuario 2018. Ministerio de Agroindustria, Consejo Federal Agropecuario. Buenos Aires, 5 de marzo 2018
- Jiao, Y., Li, J., Li, W., Chen, M., Li, M., Liu, W., Liu, C., & Chen, S. (2020). QTL Mapping and Prediction of Haploid Male Fertility Traits in Maize (*Zea mays* L.). *Plants*, 9(7), 836. <https://doi.org/10.3390/plants907083>
- Kelliher, T., Starr, D., Richbourg, L., Chintamanani, S., Delzer, B., Nuccio, M. L., Green, J., Chen, Z., McCuiston, J., Wang, W., Liebler, T., Bullock, P., & Martin, B. (2017). MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction. *Nature*, 542(7639), 105–109.
- Kindiger, B., & Hamann, S. (1993). Generation of haploids in maize: A modification of the indeterminate gametophyte (ig) system. *Crop Science*, 33(2), p. 342.
- Kleiber, D., Prigge, V., Melchinger, A. E., Burkard, F., San Vicente, F., Palomino, G., & Gordillo, G. A. (2012). Haploid Fertility in Temperate and Tropical Maize Germplasm. *Crop Science*, 52, 623-630. <https://doi.org/10.2135/cropsci2011.07.0395>
- Liu, C., Li, X., Meng, D., Zhong, Y., Chen, C., Dong, X., Xu, X., Chen, B., Li, W., Li, L., Tian, X., Zhao, H., Song, W., Luo, H., Zhang, Q., Lai, J., Jin, W., Yan, J., & Chen, S. (2017). A 4-bp Insertion at *ZmPLA1* Encoding a Putative Phospholipase A Generates Haploid Induction in Maize. *Molecular plant*, 10(3), 520–522.
- Li, L., Xu, X., Jin, W., & Chen, S. (2009). Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. *Planta*, 230(2), 367–376.
- Li, Y., Lin, Z., Yue, Y., et al. (2021). Loss-of-function alleles of *ZmPLD3* cause haploid induction in maize. *Nature Plants*, 7, 1579–1588.

- Ma, H., Li, G., Würschum, T., Zhang, Y., Zheng, D., Yang, X., Li, J., Liu, W., Yan, J., & Chen, S. (2018). Genome-Wide Association Study of Haploid Male Fertility in Maize (*Zea Mays* L.). *Frontiers in Plant Science*, 9, 974.
- Melchinger, A. E., Schipprack, W., Friedrich Utz, H., & Mirdita, V. (2014). In vivo haploid induction in maize: identification of haploid seeds by their oil content. *Crop Sci* 54, 1497–1504.
- Melchinger, A. E., Schipprack, W., Würschum, T., Chen, S., & Technow, F. (2013). Rapid and accurate identification of in vivo-induced haploid seeds based on oil content in maize. *Scientific Reports*, 3(1), 2129.
- Nanda, D. K., & Chase, S. S. (1966). An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.) 1. *Crop Science*, 6(2), 213–215.
- Olmos, S. E., Delucchi, C., Ravera, M., Negri, M. E., Mandolino, C., & Eyhéabide, G. H. (2014). Genetic relatedness and population structure within the public Argentinean collection of maize inbred lines. *Maydica*, 59(volu59), 16-31.
- Pierce, B. A. (2009). *Genética: Un enfoque conceptual*. Ed. Médica Panamericana. (pp. 44-72).
- Prasanna, B. M., Chaikam, V. & Mahuku, G. (2013). *Tecnología de dobles haploides en el mejoramiento de maíz: Teoría y práctica*. México, D.F.: CIMMYT.
- Prigge, V., Schipprack, W., Mahuku, G., Atlin, G. N., Melchinger, A. E. (2012). Development of in vivo haploid inducers for tropical maize breeding programs. *Euphytica*, 185, 481-490.
- Ren, J., et al. (2017). Novel technologies in doubled haploid line development. *Plant Biotechnology Journal*, 15, 1361-1370.
- Ritchie, S.W. & Hanway, J.J. (1984). How a corn plant develops. Special Report 48. Cooperative Extension Service, Ames, Iowa: 17

- Röber, F. K., Gordillo, G. A., & Geiger, H. H. (2005). In vivo haploid induction in maize-performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maydica*, 50, 275–283.
- Rotarenco, V. A., Kirtoca I. H., Jacota, A. G. (2007). The possibility of identifying kernels with haploid embryos using oil content. *Maize Gen Coop NewsLett* 81,11.
- Rotarenco V. A., Dicu, G., State, D., Fuia S. (2010). New inducers of maternal haploids in maize. *Maize Genet Coop Newslett* 84, 15.
- Satorre, E. (2005). Cambios tecnológicos en la agricultura Argentina actual. Volumen 15, N° 87. Facultad de agronomía, UBA. Buenos Aires,Argentina
- Schmidt, W. (2004). Hybrid maize breeding at KWS Saat AG. *Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs*, St. Pölten, pp 1–6.
- Seitz, G. (2005). The use of doubled haploids in corn breeding. *Proceedings 41st Annual Illinois Corn Breeders' School 2005*. Urbana–Champaign, Illinois, pp 1–7.
- Trentin, H., Frei, U. K., & Lübberstedt, T. (2020). Breeding Maize Maternal Haploid Inducers. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(5), 614.
- Weber, D. F. (2014). Today's use of haploids in corn plant breeding. En D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* 123, pp. 123–144.
- Wu, P., Li, H., Ren, J., & Chen, S. (2014). Mapping of maternal QTLs for in vivo haploid induction rate in maize (*Zea mays L.*). *Euphytica; Netherlands Journal of Plant Breeding*, 196(3), 413–421.
- Wu, J.-z., Zhang, J., Ge, Z.-m., Xing, L.-w., Han, S.-q., Shen, C., & Kong, F.-t. (2021). Impact of climate change on maize yield in China from 1979 to 2016. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(1), 289-299.
[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63244-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63244-0)
- Xu, X., Li, L., Dong, X., Jin, W., Melchinger, A. E., & Chen, S. (2013). Gametophytic and zygotic selection leads to segregation distortion through in

vivo induction of a maternal haploid in maize. *Journal of Experimental Botany*, 64(4), 1083–1096.

- Zhong, Y., Liu, C., Qi, X., Jiao, Y., Wang, D., Wang, Y., Liu, Z., Chen, C., Chen, B., Tian, X., Li, J., Chen, M., Dong, X., Xu, X., Li, L., Li, W., Liu, W., Jin, W., Lai, J., & Chen, S. (2019). Mutation of ZmDMP enhances haploid induction in maize. *Nature Plants*, 5, 575–580. doi:10.1038/s41477-019-0449-1

