

CAMBIOS DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS EN UN COMPUESTO DE MAÍZ A TRAVÉS DE TRES CICLOS DE SELECCIÓN RECURRENTE

Butrón A; Tarrío R;Revilla P; Ordás A; Malvar RA
Misión Biológica de Galicia, CSIC, Apdo. 28, 36080 Pontevedra

INTRODUCCIÓN

Sesamia nonagrioides Lèfebvre es la principal plaga del maíz en el área mediterránea (Cordero et al. 1998). De entre los materiales evaluados para resistencia a dicha plaga destacaron diversas poblaciones provenientes del valle del Ebro y el compuesto EPS7 (Malvar et al. 1993) que fue construido con cuatro poblaciones del valle del Ebro y del este peninsular (Ordás et al. 1991). Este compuesto fue sometido a tres ciclos de selección recurrente intrapoblacional para mejorar su rendimiento y el compuesto mejorado fue denominado EPS12. Basándose en trabajos previos que determinaron que la herencia de la resistencia a *S. nonagrioides* era básicamente aditiva (Butrón et al. 1999, Cartea et al. 1999), se diseñó un programa de mejora intrapoblacional para aumentar la resistencia del compuesto EPS12. En dicho programa también se tuvo en cuenta el rendimiento como carácter secundario de mejora porque, cuando el carácter de selección es la resistencia a insectos, es común que el progreso en la selección se haga a expensas de otros caracteres agronómicos como el rendimiento (Klenke et al. 1988).

Se pueden seguir los cambios a nivel molecular asociados al proceso de selección y determinar cuáles de dichos cambios podrían ser producto de la selección direccional encaminada a aumentar la frecuencia de los alelos favorables en loci involucrados en la resistencia a *S. nonagrioides*. Dichos cambios direccionales que no puedan ser explicados por fenómenos de deriva genética serían un indicativo de la posible presencia, en las cercanías del marcador considerado, de QTLs (loci para caracteres cuantitativos) involucrados en el carácter o caracteres de selección. Los objetivos de este trabajo fueron: identificar cambios en las frecuencias alélicas de ciertos microsatélites asociados al proceso de selección e identificar regiones del genoma que pudieran estar involucradas en la herencia de los caracteres de selección.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se utilizó el compuesto EPS12 y dos ciclos de selección obtenidos a partir de él, EPS12(S)C2 y EPS12(S)C3. EPS12 sufrió tres ciclos de selección recurrente por familias S_1 para resistencia a *S. nonagrioides*. En la recolección, se escogieron las 10 familias, de las 100 evaluadas, que menor longitud de galerías mostraron, siempre que superaran la media de rendimiento del conjunto de las familias. Una vez que se obtuvieron cada uno de los tres ciclos de selección, y simultáneamente al proceso de selección, se sometieron a una generación de recombinación.

Se extrajo ADN de aproximadamente 96 plantas de cada ciclo de selección [EPS12, EPS12(S)C2, y EPS12(S)C3] de acuerdo con el procedimiento desarrollado por Liu y Whittier (1994) con ciertas modificaciones. Las amplificaciones de los microsatélites se llevaron a cabo tal y como describen Butrón et al. (2003). Después de la amplificación, los fragmentos fueron separados mediante electroforesis usando $1\times$ TBE en gel de poliacrilamida no desnaturalizante (Shi et al. 2001). Se usaron 70 SSR loci polimórficos distribuidos más o menos homogéneamente a lo largo del genoma del maíz. Los diferentes fragmentos para cada marcador fueron ordenados y numerados por tamaño.

El software GDA (<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome>) fue usado para estimar determinados estadísticos descriptores de la estructura genética de las poblaciones: proporción de loci polimórficos, número de alelos por locus, número de alelos por locus polimórfico, heterocigosidad media esperada (Nei 1978), heterocigosidad media observada y el coeficiente de fijación. También se determinó con el mismo software qué proporción de loci estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Se construyó un programa con el módulo IML de SAS (SAS 2000) para llevar a cabo el test de Schaffer (Schaffer et al. 1977). Este test se basa en la idea de que si la selección está actuando de una manera direccional sobre un determinado locus, debería observarse una tendencia lineal en las frecuencias génicas que podría ser estimada y comprobarse si dicha estima difiere significativamente de la esperada en un modelo en el que sólo se considere el efecto de la deriva genética.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como el muestreo de las poblaciones EPS12, EPS12(S)C2 y EPS12(S)C3 se hizo tras dos generaciones de recombinación en las que se supone que el apareamiento fue al azar, las heterocigosidad observada y esperada dentro de cada ciclo deberían ser similares tal y como sucede en EPS12(S)C2 y EPS12(S)C3 (Tabla 1). Sin embargo, en la población inicial, el índice de fijación difirió significativamente de cero [0,0364, IC=(0,0006 - 0,07089)], lo que quiere decir que el exceso de homocigotos con respecto a la proporción esperada bajo las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg fue significativo. Se observó que en la población inicial había mayor número de marcadores (14 microsatélites), cuyas frecuencias genotípicas diferían significativamente de las esperadas bajo condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg, que en EPS12(S)C2 (10 microsatélites) y EPS12(S)C3 (7 microsatélites). La selección natural y la ausencia de apareamiento al azar parecen las causas más probables del exceso de homocigotos encontrado en EPS12. Un cierto número de cruzamientos entre plantas con ciclos de floración similares pudo ser la causa del desequilibrio en el apareamiento, coincidiendo con las observaciones hechas por Labate et al. (2000). Pero, en general, las recombinaciones llevadas a cabo en cada una de las tres poblaciones pueden considerarse como un apareamiento al azar porque la mayoría de los marcadores estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Como se puede observar en la tabla 1, el número de loci polimórficos, de alelos por locus, de alelos por locus polimórficos y la heterocigosidad esperada o diversidad genética disminuyeron con el proceso de selección como era de esperar, ya que tanto la deriva genética como la selección pueden causar una disminución de la variación genética. Si asumimos un tamaño efectivo de la población igual al número de familias S_1 seleccionadas en cada ciclo ($N_e = 10$), la pérdida de variación fue consistente con la expectación teórica [$H_t = H_e(\text{EPS12}) (1 - \frac{1}{2N_e})^t$, $H_{\text{EPS12(S)C3}} = 0,3977$], en un modelo en el que la deriva genética actúa sobre alelos neutros, ya que la heterocigosidad esperada en EPS12(S)C3 fue $0,3846 \pm 0,2268$. Sin embargo, el test de Schaffer detectó que los cambios en algunas frecuencias alélicas eran significativamente mayores que los esperados por el efecto de la deriva genética. La suma de cuadrados debida a la desviación del modelo en el que sólo actúa la deriva genética fue subdividida en dos componentes, uno de los cuales incluye todos los efectos debidos a cambios lineales en las frecuencias alélicas. Por lo tanto, la significación de este componente informa del efecto direccional de la selección sobre las frecuencias del alelo considerado. La χ^2 del efecto direccional de la selección (χ^2 lineal) fue significativa para determinados alelos de dos marcadores situados en regiones distintas del brazo largo del cromosoma 4 (Tabla 2). Altas correlaciones entre las frecuencias alélicas de esos marcadores y el

carácter resistencia a *S. nonagrioides* en las poblaciones EPS12, EPS12(S)C2 y EPS12(S)C3, en las cuales las diferencias fenotípicas deberían haber sido maximizadas mediante la selección, permitirían la identificación de marcadores que podrían ser utilizados en un programa de selección asistida por marcadores. En estos momentos carecemos de dichos datos fenotípicos. En cualquier caso, el efecto direccional de la selección sobre algunos marcadores, sugiere la existencia de QTLs (loci para caracteres cuantitativos) para el carácter de selección en las proximidades de dichos marcadores. En un trabajo previo en el que se buscaban QTLs para resistencia a *Ostrinia nubilalis* (Papst et al. 2001), que produce daños muy similares a los de *S. nonagrioides*, se identificó un QTLs en el brazo largo del cromosoma 4, donde se han detectado cambios direccionales de algunas frecuencias alélicas debidos a la selección por resistencia a *S. nonagrioides*. La coincidencia de algunos QTL involucrados en la resistencia a *Ostrinia nubilalis* con los implicados en la resistencia a *S. nonagrioides* sería esperable, ya que se ha visto que la resistencia a ambas especies no era del todo independiente (Velasco et al. 1999).

Tabla 1. Diversidad génica, heterocigosis esperada (H_e) y observada (H_o) e índice de fijación (f) del compuesto EPS12 y dos ciclos de selección.

Ciclos de selección	Nº de loci polimórficos	Nº de alelos por locus	Nº de alelos por locus polimórfico	H_e^1	H_o	f
EPS12	70	3,29	3,29	0,4639	0,4471	0,0364*
EPS12(S)C2	68	2,87	2,95	0,4078	0,3977	0,0248
EPS12(S)C3	64	2,53	2,76	0,3846	0,3832	0,0037

¹ Heterocigosis media esperada. Las desviaciones estándar para las heterocigosis medias esperadas de EPS12, EPS12(S)C2 y EPS12(S)C3 fueron 0,2108, 0,2229 y 0,2268 respectivamente.

* Significativamente diferente de cero ($P \leq 0,05$).

Tabla 2. χ^2 de la desviación del modelo (χ^2 Desviación) que sólo asume el efecto de la deriva génica y χ^2 del efecto lineal (χ^2 Lineal) de la selección direccional que fueron significativas, señalando los alelos de los marcadores para los que fueron significativas y la localización de dichos marcadores.

Localización	SSR locus	Alelo	χ^2 Desviación ¹	χ^2 Lineal ²
4.06	umc1329	1	9,380*	9,373*
4.06	umc1329	2	9,380*	9,373*
4.11	phi076	1	9,780*	6,760*
4.11	phi076	3	9,780*	6,760*
6.03	umc1887	1	9,380*	4,758

* Significativa al 0,01.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto del Ministerio de Ciencia y Tecnología AGL2000-00961.

REFERENCIAS

- Butrón, A., Malvar, R.A., Velasco, P., Vales, M.I., Ordás, A. 1999. Combining abilities for maize stem antibiosis, yield loss and yield under infestation and non infestation with pink stem borer. *Crop Sci.* 39: 691-696.
- Butrón, R., Tarrío, R., Revilla, P., Malvar, R.A., Ordás A. 2003. Molecular evaluation of two methods for developing maize synthetic varieties. *Mol. Breed.* 12: 329-333.
- Cartea, M.E., Malvar, R.A., Butrón, A., Vales, M.I., Ordás, A.. 1999. Inheritance of antibiosis to pink stem borer, *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *J. Econ. Entomol.* 92: 994-998.
- Cordero, A., Malvar, R.A., Butrón, A., Revilla, P., Velasco, P., Ordás, A. 1998. Population dynamics and life-cycle of corn borers in south Atlantic European coast. *Maydica* 43: 5-12.
- Jampatong, C., McMullen, M.D., Barry, B.D., Darrah, L.L., Byrne, P.F., Kross, H. 2002. Quantitative trait loci for first- and second-generation European corn borer resistance derived from the maize inbred Mo47. *Crop Sci.* 42: 584-593.
- Klenke, J.R., Russell, W.A., Guthrie, W.D., Smith, O.S. 1988. Inbreeding depression and gene frequency changes for agronomic traits in corn synthetic selected for resistance to European corn borer. *J. Agric. Entomol.* 5: 225-233.
- Labate, J.A., Lamkey, K.R., Lee, M., Woodman, W. 2000. Hardy-Weinberg and linkage equilibrium estimates in the BSSS and BSCB1 random mated populations. *Maydica* 45: 243-255.
- Liu, Yao-Guang, Whittier, R.F. 1994. Rapid preparation of megabase plant DNA from nuclei in agarose plugs and microbeads. *Nucl. Acid Res.* 22: 2168-2169.
- Malvar, R.A., Cartea, M.E., Revilla, P., Ordás, A., Álvarez, A., Mansilla, J.P. 1993. Sources of resistance to pink stem borer and European corn borer in maize. *Maydica* 38: 313-319.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Ordás, A. 1991. Heterosis in crosses between American and Spanish populations of maize. *Crop Sci.* 31: 931-935.
- Papst, C., Melchinger, A.E., Eder, J., Schulz, B., Klein, D., Bohn, M. 2001. QTL mapping for resistance to European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hb.) in early maturing European dent maize (*Zea mays* L.) germplasm and comparison of genomic regions for resistance across two populations of F₃ families. *Maydica* 46: 195-205.
- SAS. 2000. The SAS System. SAS Online Doc. HTML Format Version eight. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.
- Schaffer, H.E., Yardley, D., Anderson, W.W. 1977. Drift or selection: a statistical test of gene frequency variation over generations. *Genetics* 87: 371-379.
- Shi J., Ward, R., Wand, D. 2001. Application of a high throughput, low cost, nondenaturing polyacrilamide gel system for wheat microsatellite mapping. National Fusarium Blight Forum.
- Velasco, P., Malvar, R. A., Revilla, P., Butrón, A., Ordás, A. 1999. Ear resistance of sweet corn populations to *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera:Noctuidae) and *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 92: 732-739.