



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENÉTICA

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES
ASOCIADOS CON LA CAPACIDAD DE EXPANSIÓN EN
MAÍZ PALOMERO MEDIANTE ANÁLISIS DE
SEGREGANTES EN MASA**

VIRIDIANA TREJO PASTOR

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

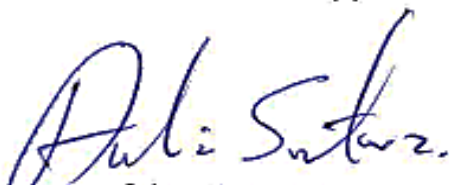
**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y
DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe **Viridiana Trejo Pastor**, alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del profesor **Amalio Santacruz Varela**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Identificación de marcadores moleculares asociados con la capacidad de expansión en maíz palomero mediante análisis de segregantes en masa** y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero o Director de Tesis y la que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Municipio de Texcoco, Estado de México, a 19 de noviembre de 2019



Firma del
Alumno (a)



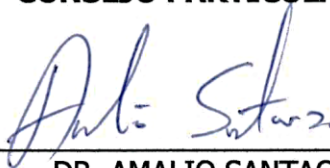
Dr. Amalio Santacruz Varela
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: “**Identificación de marcadores moleculares asociados con la capacidad expansión en maíz palomero mediante análisis de segregantes en masa**”, realizada por la alumna: **Viridiana Trejo Pastor**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. AMALIO SANTACRUZ VARELA

ASESORA:



DRA. DENISE E. COSTICH

ASESOR:



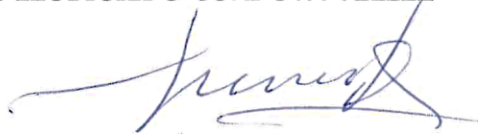
DR. HIGINIO LÓPEZ SÁNCHEZ

ASESOR:



DR. LEOBIGILDO CÓRDOVA TÉLLEZ

ASESOR:



DR. SALVADOR MIRANDA COLÍN

IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS CON LA CAPACIDAD DE EXPANSIÓN EN MAÍZ PALOMERO MEDIANTE ANÁLISIS DE SEGREGANTES EN MASA

Viridiana Trejo Pastor, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2019

RESUMEN

Las herramientas moleculares representan un apoyo para la selección de los individuos de interés, por lo que podría aplicarse en la característica comercial más importante en el maíz palomero, el volumen de expansión del almidón contenido en el endospermo. Los objetivos del presente estudio fueron identificar la población más divergente en el carácter volumen de expansión entre siete poblaciones F₂ derivadas de cruza entre una línea palomera × líneas con endospermo contrastante, para un estudio de asociación entre marcadores moleculares y el volumen de expansión mediante un análisis de segregantes en masa o BSA. La población F₂ proveniente de la cruza CML561 × CML558 con endospermo cristalino fue la más divergente, con asimetría y curtosis cercanas a cero, por lo cual se seleccionaron 100 individuos con volumen de expansión contrastante para generar dos subpoblaciones de acuerdo al análisis BSA. Los individuos y los parentales, fueron secuenciados en la plataforma DArTseq. Los datos genómicos fueron filtrados y seleccionados 553 SNP polimórficos. El análisis de asociación se realizó con modelos lineales mixtos en ambas subpoblaciones, con el software GAPIT. El estudio de asociación, mostro relaciones causales altamente correlacionadas con la estructura de la población. Los marcadores identificados se ubicaron en los cromosomas: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 y 10. Los genes candidatos, estuvieron relacionados con la estructura de la pared celular, factores de transcripción, proteínas asociadas a la membrana y el complejo transportador transmembranal, lo que sugiere que la pared celular y el pericarpio son las estructuras físicas del grano más influyentes sobre el volumen de expansión.

Palabras clave: *Zea mays*, volumen de expansión, análisis de segregantes en masa, análisis del genoma completo.

IDENTIFICATION OF MOLECULAR MARKERS ASSOCIATED WITH EXPANSION CAPACITY IN POPCORN THROUGH BULK SEGREGANT ANALYSIS

Viridiana Trejo Pastor, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

Molecular markers represent a support for selection of target individuals and could be used in the most important commercial popcorn trait the popping expansion of the starch contained in the endosperm. The aims of the present study were to find the most divergent cross in popping expansion trait of seven F_2 populations derived from biparental crosses between a popcorn \times contrasting endosperm lines to select the most appropriate population for a popping-expansion-association study between molecular markers and popping expansion through bulk segregant analysis or BSA. The most divergent F_2 population was the CML561 \times CML558 cross, with asymmetry and kurtosis close to zero whereby 100 individuals with contrasting popping expansion were selected to generate two bulks or subpopulations according to BSA methodology. The individuals and the parental lines were sequenced on DArTseq platform. Genomic data were filtered and selected 553 polymorphic SNP. The association analysis was performed with Mixed-Linear-Models in both subpopulations, with GAPIT software. The causal relationships with the popping expansion and molecular markers showed a high correlation with the population structure. Molecular markers identified were located in Chromosomes: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 and 10. Candidate genes were related with the cell wall structure, transcription factors, membrane-associated-proteins and the transmembrane transporter complex, which suggesting that cell-wall and pericarp as external structural part of the kernel are the most influential physical structures popping-expansion-related.

Keywords: *Zea mays* L., popping expansion, Bulk Segregant Analysis, Genome-wide Association Study.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para realizar mis estudios con el objetivo de obtener el grado de Doctora en Ciencias.

A la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), por el financiamiento otorgado para la secuenciación genética de la población de estudio, a través del programa Modernización Sustentable de la Agricultura Tradicional y de su línea de acción, Descubriendo la Biodiversidad Genética de la Semilla (MasAgro BIODIVERSIDAD).

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT), por la beca de titulación otorgada para la culminación del trabajo de tesis.

Al Colegio de Postgraduados (COLPOS), por facilitar el uso de sus instalaciones y el terreno para la siembra.

Al CIMMYT, por proveer el material genético evaluado en este estudio, por facilitar el uso de sus instalaciones y el terreno para la siembra.

A los integrantes del consejo particular, por su orientación y sugerencias durante el desarrollo del trabajo de investigación, así como su disposición y tiempo para la revisión de este trabajo.

Al Dr. Amalio Santacruz Varela, por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto de investigación, su paciencia, su tiempo y en especial por su amistad.

A la Dra. Denise Costich, por el apoyo otorgado en la logística de campo para la realización de este proyecto de investigación.

A la Dra. Huihui Li, por fungir como mi tutora en la estancia realizada en la Academia de Ciencias Agrícolas de China (CAAS - Crop Sciences Institute).

Al Dr. Paulino Pérez Rodríguez, por su apoyo y orientación en el análisis estadístico de los datos genéticos.

Al Dr. Cesar Petroli y al personal del Servicio de Análisis Genético para la Agricultura del CIMMYT, por el apoyo en la secuenciación de la población de estudio.

Al M.C. Roberto de la Cruz Díaz Juárez, por todo el apoyo otorgado en las diferentes etapas de este proyecto de investigación, por su apoyo moral y por ser mi compañero en la culminación de mi etapa como estudiante.

A todos los estudiantes, trabajadores de campo y trabajadores de laboratorio del COLPOS Campus Montecillo, Campus Puebla y del CIMMYT, por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo de investigación.

DEDICATORIAS

A mis padres, José Guadalupe Trejo Moreno y Ruth Pastor Cortés. Gracias por el apoyo moral, el amor que me dan y por enseñarme valores como la empatía, la congruencia y la ética, son mi ejemplo a seguir. La culminación de este proyecto es también un logro suyo.

A mis hermanos, Ruth y José Alberto, por alegrar mi vida y ser parte de este proyecto. Sólo quiero decirles que estoy muy orgullosa de ustedes, de sus éxitos y de sus logros personales. Nunca dejen de soñar y de tener nuevas metas en su camino.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Antecedentes	1
2. Planteamiento del problema	7
3. Objetivos	7
4. Hipótesis	8
5. Bibliografía	8
CAPÍTULO I. CAPACIDAD DE REVENTADO EN SEGREGANTES F₂ DE CRUZAS BIPARENTALES ENTRE LÍNEAS DE MAÍZ PALOMERO × NO PALOMERO	13
1.1. Resumen	13
1.2. Abstract	14
1.3. Introducción	15
1.4. Materiales y métodos	17
1.5. Resultados y discusión	20
1.6. Conclusiones	30
1.7. Bibliografía	30
CAPÍTULO II. DETECCIÓN DE REGIONES DEL GENOMA DEL MAÍZ PALOMERO ASOCIADAS AL VOLUMEN DE EXPANSIÓN MEDIANTE ANÁLISIS DE SEGREGANTES EN MASA	33
2.1. Resumen	33
2.2. Abstract	34
2.3. Introducción	35
2.4. Materiales y métodos	38
2.5. Resultados y discusión	44
2.6. Conclusiones	56
2.7. Bibliografía	57
DISCUSIÓN GENERAL	61
CONCLUSIONES GENERALES	64
ANEXO	65

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.1. Descripción de las CMLs adaptadas a Valles Altos, utilizadas como parentales para formar siete cruzas.	17
Cuadro 1.2. Caracteres morfológicos evaluados en el grano y las palomitas de siete poblaciones F ₂ derivadas de las cruzas entre el progenitor palomero CML561 × progenitores no palomeros.	27
Cuadro 1.3. Frecuencias fenotípicas observadas y esperadas de las poblaciones F ₂ derivadas de las cruzas entre el progenitor palomero CML561 × progenitores no palomeros, de acuerdo a los grupos de clasificación.	29
Cuadro 2.1. Descripción de las CMLs adaptadas a Valles Altos, utilizadas como parentales para formar siete cruzas biparentales.	38
Cuadro 2.2. Individuos seleccionados de la población F ₂ de la craza biparental CML561 × CML558 para conformar los grupos contrastantes con base en el VE.	42
Cuadro 2.3. Localización de SNP y genes candidatos con asociación significativa para el carácter VE con base en el $-\log_{10}$ (P valor) y MAF, del análisis de la Subpoblación 1.	53
Cuadro 2.4. Localización de SNP y genes candidatos con asociación significativa para el carácter VE con base en el $-\log_{10}$ (P valor) y MAF, del análisis de la Subpoblación 2.	54

LISTA DE CUADROS DEL ANEXO

Cuadro A1. Investigaciones realizadas para la localización de QTL relacionados con las características de reventado en maíz palomero.	65
Cuadro A2. Localización de SNP asociados significativamente con el VE basados en la estimación del $-\log_{10}$ (P valor) obtenido con el análisis de la Subpoblación 1, con el uso de G + K, de la población F ₂ derivada de la craza CML561 × CML558.	67
Cuadro A3. Localización de SNP asociados significativamente con el VE basados en la estimación del $-\log_{10}$ (P valor) obtenido con el análisis de la Subpoblación 2, con el uso de G + K, de la población F ₂ derivada de la craza CML561 × CML558.	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Situación del maíz palomero en México: Producción, consumo e importaciones de los últimos 13 años. Elaboración con datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera y del Sistema de Información Arancelaria Vía Internet (2005-2018).....	2
Figura 1.1. Frecuencia fenotípica (a) y prueba de normalidad grafica (b) para el carácter VE evaluado en la población F_2 derivada de la cruce biparental CML561 \times CML558, con endospermo cristalino.	20
Figura 1.2. Frecuencia fenotípica y prueba de normalidad grafica para el carácter VE evaluado en las poblaciones F_2 : CML561 \times CML461 (a, b); CML561 \times CML457 (c, d), con endospermo dentado.	21
Figura 1.3. Frecuencia fenotípica y prueba de normalidad grafica para el carácter VE evaluado en las poblaciones F_2 : CML561 \times CML240 (a, b); CML561 \times CML246 (c, d), con endospermo semidentado.....	22
Figura 1.4. Frecuencia fenotípica y prueba de normalidad grafica para el carácter VE evaluado en las poblaciones F_2 : CML561 \times CML459 (e, f); CML561 \times CML527 (g, h), con endospermo semidentado.	22
Figura 2.1. Frecuencia de distribución del alelo menor (MAF). a) Proporción de MAF basada en la matriz genómica con 9,906 SNP; b) Matriz filtrada por MAF \leq 0.05 con 5,526 SNP.	44
Figura 2.2. Exponenciales de Shannon-Weaver (H) de acuerdo con la información de la población, considerando el comportamiento a nivel de variantes alélicas, bajo las condiciones específicas descritas en el ensayo. En el eje Y se muestra el número de marcadores SNP.....	45
Figura 2.3. Matriz de relaciones genómicas de 100 individuos F_2 y ambos parentales, basada en 553 SNP para el carácter VE de la cruce CML561 \times CML558. Los dendogramas de los extremos representan las distancias entre grupos usando el método de agrupamiento por promedio aritmético de grupos de pares no ponderados (UPGMA).....	46
Figura 2.4. Grafica Cuántil-Cuántil de valores predichos vs observados del análisis GWAS, utilizando MLM considerando la matrices G +K y tres componentes principales para control de la estructura de la población. a) Subpoblación 1; b) Subpoblación 2.	48
Figura 2.5. Gráfica Manhattan del modelo MLM. En el eje X se presenta la posición de los SNP en el genoma y en el eje Y el $-\log_{10}$ (Valor P). Cada cromosoma está representado con un color diferente. Los SNP con asociaciones fuertes con el VE presentan un valor alto en la coordenada del eje Y. a) Subpoblación 1; b) Subpoblación 2.	51

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Antecedentes

El maíz palomero es el más antiguo del mundo, Wellhausen y colaboradores (1951) clasificaron a estas razas como Antiguas Indígenas, contemplando las razas: Palomero Toluqueño, Arrocillo-Amarillo, Chapalote, Nal-tel y Palomero de Jalisco, descendientes de un maíz primitivo de carácter reventador que hoy se sabe es el teocintle (Beadle, 1939; Doebley, 2004; Matsuoka *et al.*, 2002; Miranda, 1966). En clasificaciones más recientes, se mencionan otras razas con capacidad de expansión del endospermo como: Reventador (Anderson, 1944) y Palomero de Chihuahua (Ortega, 1989), de las cuales aún existe una buena cantidad que se desarrollan en altitudes que van de los 100 m hasta las zonas más frías de la frontera agrícola a 3,500 m de altitud, existiendo variedades resistentes a factores adversos como sequía, calor, heladas y anoxia (Muñoz, 2003). Estas razas junto con el teocintle se usaron, más frecuentemente extrayendo el jugo dulce del tallo, como pinole, palomitas y en rituales de diversas etnias desde épocas prehispánicas, que en masa nixtamalizada, pues este proceso fue descubierto cientos de años después (Beadle, 1939; Romero *et al.*, 2006).

La característica comercial más importante de los maíces palomeros, es la capacidad de expansión del endospermo, la cual se observa como el incremento en el volumen del grano debido a la formación de las palomitas al someterlo a una fuente de calor. El proceso de formación de las palomitas, se desarrolla en diferentes etapas, las cuales se describen a continuación: 1) inicio del proceso de expansión a través de la nucleación, 2) proceso de expansión real de los gránulos de almidón, debido al crecimiento de burbujas de vapor, 3) fin del proceso de expansión a través de la apertura del pericarpio, 4) posible ruptura (parcial) de la célula, 5) contracción del almidón debido a un secado adicional, si todavía está en estado gomoso y 6) fijación de la estructura expandida si el almidón entra en estado vítreo. Gran parte de los mecanismos de reventado se han estudiado con la forma tradicional de este proceso, a través del uso de aceite como dispersor de calor. En este proceso el pericarpio actúa como un recipiente de presión y barrera contra la humedad. La rigidez del pericarpio hace que se produzca un reventado cuando el grano ha alcanzado una temperatura de aproximadamente 180 °C, correspondiente a una presión de vapor de aproximadamente 9 atmosferas (Mishra *et al.*, 2014; Sweley *et al.*, 2013; van der Sman y Bows, 2017).

A nivel mundial, las palomitas de maíz son la “botana” más antigua y popular y su consumo va en aumento, principalmente en los hogares (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2019; <https://www.popcorn.org>). En México, el consumo de maíz palomero promedio es de 66.4 mil t año⁻¹ de grano, de las cuales sólo se producen 1.5 mil t año⁻¹ por lo que el 98 % del volumen restante se importa, principalmente de EE.UU. y en menor proporción de Argentina (SIAP y SIAVI, promedio de años 2008 a 2018), la tendencia a las importaciones va en aumento contrario a la producción nacional, ello en perjuicio de las razas nativas de maíz palomero y de los agricultores y custodios que las conservan (Figura 1).

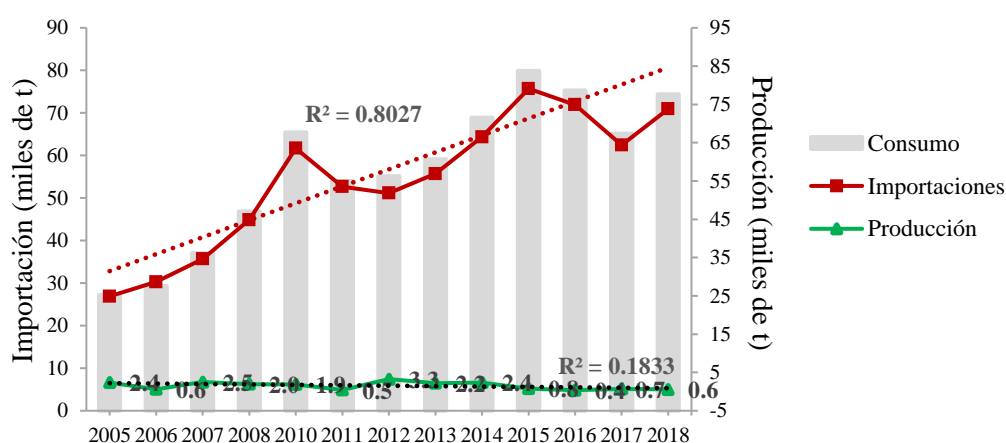


Figura 1. Situación del maíz palomero en México: Producción, consumo e importaciones de los últimos 13 años. Elaboración con datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera y del Sistema de Información Arancelaria Vía Internet (2005-2018).

La escasa producción de este grano a nivel nacional, se debe a la inexistencia de programas gubernamentales e institucionales de mejoramiento genético de las razas nativas de maíz palomero, razón por la cual no se han desarrollado variedades nacionales adaptadas a diversas condiciones agroclimáticas (de la O-Olán *et al.*, 2018). Lo anterior aunado a la poca selección en las poblaciones de estas razas para el incremento del volumen de expansión, ello queda evidenciado en un estudio realizado por Santacruz-Varela *et al.* (2004) en el cual compararon el volumen de expansión del grano entre muestras de razas mexicanas con muestras de maíces norteamericanos de la raza North American Yellow Pearl Popcorn, el resultado obtenido fue una relación de reventado de 1:24 a favor de la raza norteamericana (48.8 vs. 1 166 cm³ 30 g⁻¹).

Sin embargo, las razas palomeras presentan potencial para generar variedades mejoradas con calidad comercial, lo cual queda demostrado en un estudio realizado por Vázquez-Carrillo *et al.*, (2019) quienes evaluaron la raza Chapalote e identificaron colectas con un volumen de expansión aceptable, comparadas con un híbrido comercial (26.1 vs. 35.8 cm³ g⁻¹).

El primer antecedente a nivel nacional sobre mejoramiento genético del maíz palomero mexicano se realizó en 1966, enfocado al incremento de la capacidad de expansión de la variedad Xaltepa I, con base en la selección recurrente, utilizando como técnica la densidad específica asociada a la capacidad de expansión, teniendo como resultado un incremento del 5 % en el volumen en dos ciclos (Robles y Covarrubias, 1966); sin embargo, no se le dio continuidad al proyecto.

En cuanto a los apoyos gubernamentales, en la década de los 80's se puso en marcha el "Programa Nacional de Maíz Palomero" a través de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). En este proyecto participaron conjuntamente productores, empresas y gobierno de los Estados: Tamaulipas, Durango, Chihuahua, Coahuila, Jalisco, Guanajuato, Querétaro, Estado de México e Hidalgo, con una superficie total de 7,432 ha con rendimientos hasta de 3 t ha⁻¹. Para el año de 1981, la producción nacional de maíz palomero se centró en la zona norte del estado de Tamaulipas (lo cual permanece en la actualidad), con un rendimiento promedio de 2.55 t ha⁻¹ y una producción de 23,141 t año⁻¹, con un consumo nacional de 21 mil t año⁻¹, por lo que el remanente se exportaba. Posteriormente, se presentó un decremento en la superficie sembrada debido principalmente a factores climáticos adversos como sequía, ya que no se contaba con variedades adaptadas a los nichos ecológicos en los que se sembraba este tipo de maíz, perdiéndose este importante esfuerzo en los años siguientes (SARH-DGEA, 1983).

En el año 2008, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) puso en marcha el "Proyecto Nacional de Mejoramiento de Maíz Palomero" con sede en Tamaulipas, entidad donde la siembra de este, se realiza empleando híbridos importados. Como resultado del proyecto se generó la variedad de polinización libre V-460 P a partir de un compuesto de amplia base genética, con germoplasma introducido del estado de Iowa (EE.UU.), denominado "compuesto de maíz palomero 1", generado mediante Selección Masal Visual Estratificada, tomando como característica principal la expansión del grano ($\approx 30 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$), esta variedad se encuentra registrada en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales desde el 2014, sin embargo; no tiene un uso representativo en México (Valadez-Gutiérrez *et al.*, 2014).

En la actualidad, existen apoyos para la producción de maíz por parte de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural que incluyen el sistema milpa, enfocados a pequeños y medianos productores, a través de los programas: Producción para el Bienestar, Programa Nacional de Fertilizantes, Programa de Precios de Garantía a Productos Alimentarios Básicos y el Programa de Fomento a la Agricultura (SADER, 2019); sin embargo, para desarrollar un plan nacional que aborde el mejoramiento de las razas de maíz palomero en los nichos ecológicos donde se desarrollan y sean a su vez atractivas al mercado, es necesario trabajar con los agentes causales de la calidad para producción comercial, los cuales son básicamente: volumen de expansión, ya que este tipo de grano se compra por peso y se vende por volumen, granos no reventados y tipo de reventado o forma de palomita, que determina el destino de la producción (Gökmen, 2004; Hosney *et al.*, 1983; Sweley *et al.*, 2012; Sweley *et al.*, 2013; Vázquez-Carrillo *et al.*, 2019; Ziegler, 2001).

Un primer paso para lograr ganancia genética en las razas de maíz palomero y hacerlas más atractivas al mercado, es realizar mejoramiento genético por el método de selección. Así mismo se deben valorar las características constitutivas del grano que confieren una mayor capacidad de expansión, por ejemplo la influencia del endospermo en la formación de las palomitas, pero a la fecha, no se han realizado estudios que evalúen de manera simultánea la atribución que representa cada tipo de endospermo sobre el volumen de expansión, existiendo pocas referencias que abordan la genética del carácter, por lo cual se deben hacer estudios que contemplen cruza entre maíz palomero por líneas con endospermo contrastante, para determinar su influencia en el reventado, ello adquiere relevancia debido a que por diversas investigaciones se sabe que algunas características fisicoquímicas del grano como: tamaño, una disposición más cristalina en el endospermo, dureza, relación de amilosa-amilopectina, un mayor grado de empaquetamiento fibrilar en el pericarpio, porosidad, contenido de humedad, perfiles proteicos del endospermo y pericarpio y la composición de ácidos grasos, son los principales responsables de la formación de palomitas en maíces palomeros (Borras *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 1993; Dong *et al.*, 2015; Ertaş *et al.*, 2009; Gökmen, 2004; Hosney *et al.*, 1983; Karababa, 2006; Park *et al.*, 2000; Sweley *et al.*, 2012; Vázquez-Carrillo *et al.*, 2019), por ende los genes candidatos están involucrados en la síntesis de almidón, proteínas de almacenamiento, lípidos y polisacáridos de la pared celular (Paes *et al.*, 2016).

Por otro lado, los avances en el uso de herramientas moleculares para asistir al mejoramiento genético (Marker Assisted Selection) son cada vez más accesibles, lo cual representa un ahorro en tiempo y recursos, al tratarse de una evaluación temprana y no destructiva de los genotipos en la búsqueda de genes que se expresan en determinadas etapas del desarrollo como: floración, fructificación o en semilla (Collard y Mackill, 2008). Una de estas herramientas es el genotipo por secuenciación o GbS (Genotyping-by-Sequencing) utilizando marcadores polimórficos y enzimas de restricción sensibles a la metilación, lo cual simplifica la alineación de las secuencias. Su aplicación es amplia ya que no requiere un genoma de referencia, es altamente reproducible y puede utilizarse para explorar la diversidad dentro y entre especies, en la construcción de mapas de haplotipos, en la identificación de regiones asociadas al carácter cuantitativo de interés o QTL (Quantitative Trait Loci) y en estudios de asociación del genoma completo o GWAS (Genome-wide Association Study), con el fin de una selección objetiva de individuos destacados en las poblaciones de interés (Elshire *et al.*, 2011).

La tecnología de GbS y otras basadas en secuencias como DArTseq (Diversity Arrays Technology) han evolucionado como uno de los principales métodos para el genotipo basado en secuenciación de siguiente generación (Next Generation Sequency), cada uno adaptado para diferentes aplicaciones; por ejemplo, el GbS genera una densidad alta de marcadores (> 800 mil SNP) con una cobertura relativamente baja (profundidad de secuenciación en loci particulares, 0.5X) y una tasa de datos faltantes ≥ 50 %; sin embargo, se utiliza de manera efectiva en estudios que emplean poblaciones estructuradas donde la imputación se implementa con alta precisión sobre los datos faltantes y es crítico en estudios que involucran una asociación amplia del genoma (GWAS) donde se requiere una alta densidad de marcadores. En contraste, la tecnología DArTseq (Sansaloni *et al.*, 2011) genera una menor densidad de marcadores (50 a 350 mil SNP) pero con una mayor cobertura y niveles más bajos de datos faltantes (≤ 20 %) en comparación con el GbS para el caso de maíz (Chen *et al.*, 2016), son utilizados en muestras heterogéneas, para la selección genómica y en estudios de diversidad.

Como se ha mencionado, en el proceso de reventado influyen características fisicoquímicas del grano, las cuales se han estudiado a nivel molecular para identificar regiones en el genoma con efectos causales en este proceso. Ejemplo de ello son los diversos estudios desarrollados con el objetivo de identificar alelos involucrados en caracteres de interés, como: volumen de expansión, forma de palomita, granos no reventados, peso de grano y rango de expansión, en

los cuales se han reportado desde tres hasta 9 mQTL (Apéndice 1). Los estudios realizados para afirmar lo anterior se basan en poblaciones F_2 , F_3 , BC_1 , BC_2 , BC_2F_2 , y RILs de cruza biparentales entre líneas de endospermo dentado y/o cristalino por una línea palomera, así como en poblaciones y líneas de maíz palomero y maíz dentado, utilizando como marcadores microsatélites o SSR y polimorfismos de nucleótido individual o SNP (Babu *et al.*, 2006; Dhliwayo, 2008; Dong *et al.*, 2012, 2015; Li *et al.*, 2006, 2007, 2008, 2009; Liu *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2003; Paes *et al.*, 2016; Senhorinho *et al.*, 2019); sin embargo, son pocos los QTL consenso reportados, debido a factores como la interacción con el ambiente y al tipo de población de análisis utilizada (Coan *et al.*, 2019; Dhliwayo, 2008; Senhorinho *et al.*, 2019).

Algunos estudios han involucrado al maíz dentado como uno de los parentales en los análisis genéticos, pero los esfuerzos para desentrañar información sobre la capacidad del maíz cristalino no palomero (Babu *et al.*, 2006; Coan *et al.*, 2019; Robbins and Ashman, 1984) y otros tipos de endospermo harinoso como el maíz semidentado para contribuir a un mayor volumen de expansión han sido limitados, así mismo se ha hipotetizado que la capacidad de expansión en maíz, es un carácter cuantitativo, de tipo aditivo y que está condicionado por cuatro a cinco genes de efectos mayores (Ashman, 1983; Ziegler, 2001); otros autores postulan que este carácter está controlado por tres a cuatro genes de efectos mayores (Lu *et al.*, 2003); sin embargo, estos estudios no mencionan la metodología utilizada para afirmar lo anterior.

Una estrategia para reducir los costos y eficientizar recursos en la búsqueda de regiones causales o de genes candidatos involucrados en la capacidad de expansión, es el análisis de segregantes en masa o agrupados, conocido como análisis BSA (Bulk Segregant Analysis). Este método fue propuesto por Michelmore *et al.* (1991) utilizando marcadores moleculares RAPD. El método consiste en comparar dos grupos de muestras de ADN (bulks) de individuos pertenecientes a una población segregante, que se encuentren en desequilibrio de ligamiento.

Los grupos contrastantes se constituyen agrupando individuos por similitud para un fenotipo o gen de interés, se analizan independientemente, utilizando técnicas como el GbS o DArTseq, pues es relativamente barato y rápido, además de que posibilita el uso de marcadores de alta densidad como los SNP y por ello la precisión de la secuenciación aumenta. Un ejemplo en cuanto a la reducción de costos es considerando una población de 500 individuos, de la cual son seleccionados 25 extremos para formar cada grupo, el análisis BSA solo costará 0.4 % (2 bulks/500 individuos) del costo requerido para el análisis de toda la población (Zou *et al.*, 2016).

Actualmente, el análisis BSA se ha modificado, mediante el uso de poblaciones con un mayor número de individuos, tamaños de cola aumentados y marcadores de alta densidad (Sun *et al.*, 2010). Las poblaciones de análisis más utilizadas son las biparentales segregantes o con extremos fenotípicos contrastantes, como: F₂, F_{2:3}, BC₁, RILs (líneas endogámicas recombinantes) y DH (haploides duplicados), estas dos últimas consisten en líneas homocigóticas individuales que pueden mantenerse por autopolinizaciones y evaluarse en múltiples ambientes (Michelmore *et al.*, 2006; Zou *et al.*, 2016). Por otra parte se considera que los polimorfismos de nucleótido individual o SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) son el tipo de marcador óptimo para el genotipo de calidad en cultivos (Semagn *et al.*, 2014).

2. Planteamiento del problema

Es evidente que hacen falta estudios que aborden de manera simultánea la influencia de los diferentes tipos de endospermo sobre los caracteres de mayor interés en los maíces palomeros, una reestimación del número de genes involucrados en la capacidad de expansión utilizando poblaciones divergentes con un número significativo de individuos ($n > 300$ individuos), así como realizar estudios genotípicos por el método BSA para identificar marcadores moleculares asociados a la capacidad de expansión, lo que hará posible desarrollar una metodología asistida por marcadores a mediano plazo, con la meta de realizar selección de forma más eficiente en las razas nativas de maíz palomero. Es por ello que el presente trabajo tuvo como objetivos:

3. Objetivos

General

- Identificar marcadores moleculares asociados al volumen de expansión mediante análisis de segregantes en masa.

Específicos

1. Evaluar la capacidad de expansión en poblaciones F₂ derivadas de cruza biparentales entre una línea de maíz palomero × líneas de maíz con endospermo contrastante, para identificar la población más apropiada para un estudio genético de ligamiento por asociación.

2. Realizar un estudio de asociación entre los marcadores moleculares y el volumen de expansión y realizar la búsqueda de genes candidatos.

4. Hipótesis

- La capacidad de expansión en el maíz palomero está influenciada por las características del endospermo, siendo el cristalino el que le confiere esa capacidad.
- Son pocos los genes que intervienen en la capacidad de expansión del maíz palomero.
- Los marcadores moleculares más informativos están relacionados con genes que se expresan principalmente en características del endospermo y del pericarpio.

5. Bibliografía

- Anderson E. (1944)** Maíz reventador. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 31:30-315.
- Ashman R. B. (1983)** Popcorn. Plant disease control. Bulletin BP-4. *Historical Documents of the Purdue Cooperative Extension Service*. Purdue University, West Lafayette, Indiana EE.UU., <https://docs.lib.purdue.edu/agext/439>
- Babu R., S. K. Nair, A. Kumar, H. S. Rao, P. Verma, A. Gahalain, I. S. Singh and H. S. Gupta (2006)** Mapping QTLs for popping ability in a popcorn × flint corn cross. *Theoretical and Applied Genetics* 112:1392-1399, <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0242-1>
- Beadle G. W. (1939)** Teosinte branched1 and the origin of Maize. *Journal of Heredity* 30:245–247.
- Borras F., K. Seetharaman, N. Yao, J. L. Robutti, N. M. Percibaldi and G. H. Eyherabide (2006)** Relationship between popcorn composition and expansion volume and discrimination of corn types by using zein properties. *Cereal Chemistry* 83:86-92, <https://doi.org/10.1094/CC-83-0086>
- Chen, J., C. Zavala, N. Ortega, C. Petroli, J. Franco, J. Burgueño, D. Costich and S. Hearne (2016)** The development of quality control genotyping approaches: A case study using elite maize lines. *PLoS ONE* 11:e0157236, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157236>
- Coan M. M. D., R. J. B. Pinto, M. C. Kuki, A. T. do Amaral Júnior, A. S. T. Figueiredo, C. A. Scapim and M. Warburton (2019)** Inheritance study for popping expansion in popcorn vs. flint corn genotypes. *Agronomy Journal* 111:2174–2183, <https://doi.org/10.2134/agronj2019.04.0295>

- Collard B. C. and D. J. Mackill (2008)** Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 363:557-572, <http://doi.org/10.1098/rstb.2007.2170>
- da Silva W. J., B. C. Vidal, M. E.Q. Martins, H. C. vargas, C. Pereira M. zerbetto and L. C. M. Miranda (1993)** What makes popcorn pop. *Nature* 362:417, <https://doi.org/doi:10.1038/362417a0>
- De la O-Olán, M., A. Santacruz-Varela, D. M. Sangerman-Jarquín, A. J. Gámez-Vázquez, J. L. Arellano-Vázquez, M. G. Valadez-Bustos, M. A. Avila Perches (2018)** Estandarización del método de reventado para la evaluación experimental del maíz palomero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9:1471-1483, <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i7.1675>
- Dhliwayo T. (2008)** Genetic mapping and analysis of traits related to improvement of popcorn. Retrospective Theses and Dissertations. 15863. UMI Number: 3296798, <http://lib.dr.iastate.edu/rtd/15863>
- Doebley J. (2004)** The genetics of maize evolution. *Annual Review of Genetics* 38:37-59, <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.092425>
- Dong Y, Z. Zhang, Q. Shi, Q. Wang, Q. Zhou and Y. Li (2012)** Quantitative trait loci mapping and meta-analysis across three generations for popping characteristics in popcorn. *Journal of Cereal Science* 56:581-586. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.08.006>
- Dong Y., Z. Zhang, Q. Shi, Q. Wang, Q. Zhou and Y. Li (2015)** QTL identification and meta-analysis for kernel composition traits across three generations in popcorn. *Euphytica* 204:649-660, <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1360-0>
- Elshire R. J., J. C. Glaubitz, Q. Sun, J. A. Poland, K. Kawamoto, E. S. Buckler, S. E. Mitchell (2011)** A robust, simple Genotyping-by-Sequencing (GbS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* 6:e19379, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>
- Ertaş N., S. Soylu and N. Bilgiçli (2008)** Effects of kernel properties and popping methods on popcorn quality of different corn cultivars. *Journal of Food Process Engineering* 32:478-496, <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2007.00228.x>
- Gökmen S. (2004)** Effects of moisture content and popping method on popping characteristics of popcorn. *Journal of Food Engineering* 65:357-362, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.01.034>
- Hoseney R.C., K. Zeleznak and A. Abdelrahman (1983)** Mechanism of popcorn popping. *Journal of Cereal Science* 1:43-52, [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(83\)80007-1](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(83)80007-1)
- Karababa, E. (2006)** Physical properties of popcorn kernels. *Journal of Food Engineering* 72:100-107, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.11.028>
- Li, Y. L., Y. B. Dong and S. Z. Niu (2006)** QTL analysis of popping fold and the consistency of QTLs under two environments in popcorn. *Acta Genetica Sinica* 33:724-732, [https://doi.org/10.1016/S0379-4172\(06\)60105-4](https://doi.org/10.1016/S0379-4172(06)60105-4)
- Li, Y. L., Y. B. Dong, S. Z. Niu, D. Q. Cui (2007)** QTL for popping characteristics in popcorn. *Plant Breeding* 126:509-514, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01372.x>

- Li, Y. L., Y. B. Dong, D. Q. Cui, Y. Z. Wang, Y. Y. Liu, M. G. Wei, X. H. Li (2008)** The genetic relationship between popping expansion volume and two yield components in popcorn using unconditional and conditional QTL analysis. *Euphytica* 162:345-351, <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9513-4>
- Li Y. L., Y. B. Dong, S. Z. Niu and D. Q. Cui (2009)** Identification of QTL for popping characteristics using a BC₂F₂ population and comparison with its F_{2:3} population in popcorn. *Agricultural Sciences in China* 8:137-143, [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60020-1](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60020-1)
- Liu Y., Y. Dong, S. Niu, D. Cui, Y. Wang, M. Wei, X. Li, J. Fu, Z. Zhang, H. Chen and Y. Li (2008)** QTL identification of kernel composition traits with popcorn using both F_{2:3} and BC₂F₂ populations developed from the same cross. *Journal of Cereal Science* 48:625-631, <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.02.003>
- Lu H. J., R. Bernardo and H. W. Ohm (2003)** Mapping QTL for popping expansion volume in popcorn with simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 106:423-427, <http://doi/10.1007/s00122-002-1041-y>
- Matsuoka, Y., Y. Vigouroux, M. M. Goodman, J. G. Sanchez, E. Buckler, J. Doebley (2002)** A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:6080–6084, <https://doi.org/10.1073/PNAS.052125199>
- Michelmore R. W., I. Paran and R. V. Kesseli (1991)** Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:9828-9832.
- Miranda C. S. (1966)** Discusión sobre el origen y la evolución del maíz. Memorias del Segundo Congreso Nacional de Fitogenética. SOMEFI, A.C. Escuela de Agricultura y Ganadería el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Monterrey N.L., México. pp:233-251.
- Mishra G., D. C. Joshi and P. B. Kumar (2014)** Popping and puffing of cereal grains: A review. *Journal of Grain Processing and Storage* 1:34-46.
- Muñoz O. A. (2003)** Centli-Maíz. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, México. 211 p.
- Ortega P. R. y G. J. Sánchez (1989)** Aportaciones al estudio de la diversidad de maíz de las partes altas de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 12:105-119.
- Paes G. P., J. M. S Viana, F. F. E. Silva and G. B. Mundim (2016)** Linkage disequilibrium, SNP frequency change due to selection, and association mapping in popcorn chromosome regions containing QTLs for quality traits. *Genetics and Molecular Biology* 39:97-110, <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0126>
- Park D., K. G. D. Allen, F. R. Stermitz and J. A. Maga (2000)** Chemical composition and physical characteristics of unpopped popcorn hybrids. *Journal of Food Composition and Analysis* 13:921-934, <https://doi.org/10.1006/jfca.2000.0943>

- Robbins W .A. and R. B. Ashman (1984)** Parent-offspring popping expansion correlations in progeny of dent corn × popcorn and flint corn × popcorn crosses. *Crop Science* 24:119-121, <https://doi.org/10.2135/cropsci1984.0011183X002400010027x>
- Robles S. R. y R. Covarrubias (1966)** Mejoramiento de la capacidad de expansión en maíces palomeros. *Agrociencia* 1:91-99.
- Romero C., T., L. González D., L. y G. Reyes R. (2006)** Geografía e historia cultural del maíz palomero toluqueño (*Zea mays everta*). *CIENCIA ergo sum* 13:47-56.
- SARH, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (1983)** Programa nacional de maíz palomero, temporada 1982-83. Departamento de comunicación y publicaciones de la Dirección General de Economía Agrícola en el Estado de Tamaulipas, México. 25 p.
- SADER, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2019)** Programas Agricultura de la SADER, Municipio Libre 377, Santa Cruz Atoyac, Ciudad de México, México, <https://www.gob.mx/agricultura/acciones-y-programas/programas-sader-2019-194732>
- Sansaloni C., C. Petrolí, D. Jaccoud, J. Carling, F. Detering, D. Grattapaglia and A. Kilian (2011)** Diversity Arrays Technology (DArT) and next-generation sequencing combined: genome-wide, high throughput, highly informative genotyping for molecular breeding of Eucalyptus. *BMC Proceedings* 5:P54, <http://doi.org/10.1186/1753-6561-5-s7-P54>
- Santacruz-Varela A., K. E. Ziegler, P. K. Bretting, M. P. Widrlechner, M. J. Millard and R. J. Salvador (2004)** Phylogenetic relationships among North American popcorns and their evolutionary links to Mexican and South American popcorns. *Crop Science* 44:1456-1467, <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1456>
- Senhorinho H. J. C., M. M. D. Coan, T. P. Marino, M. C. Kuki, R. J. B. Pinto, C. A. Scapim and J. B. Holland (2019)** Genomic-Wide Association Study of Popping Expansion in Tropical Popcorn and Field Corn Germplasm. *Crop Science* 59:2007-2019, <https://doi.org/10.2135/cropsci2019.02.0101>
- Semagn K., R. Babu, S. Hearne and M. Olsen (2014)** Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): Overview of the technology and its application in crop improvement. *Molecular Breeding* 33:1-14, <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9917-x>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2005-2018)** Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Producción de maíz palomero, Benjamín Franklin 146, Escandón, Miguel Hidalgo, Ciudad de México, México, <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Octubre, 2019).
- SIAVI, Sistema de Información Arancelaria Vía Internet (2005-2018)** Información de las Importaciones de maíz palomero. Capítulo 10059001, Insurgentes Sur 1940, Colonia Florida, Delegación Álvaro Obregón, Ciudad de México, México, <http://www.economia-snci.gob.mx/> (Octubre, 2019).
- Sun Y., J. Wang, J. H. Crouch and Y. Xu (2010)** Efficiency of selective genotyping for genetic analysis of complex traits and potential applications in crop improvement. *Molecular Breeding* 26:493-511, <https://doi.org/10.1007/s11032-010-9390-8>

- Sweley J. C., D. J. Rose, D. S. Jackson (2012)** Hybrid and environment effects on popcorn kernel physiochemical properties and their relationship to microwave popping performance. *Journal of Cereal Science* 55:188-194, <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.11.006>
- Sweley J. C., D. J. Rose and D. S. Jackson (2013)** Quality traits and popping performance considerations for popcorn (*Zea mays everta*). *Food Reviews International* 29:157-177, <https://doi.org/10.1080/87559129.2012.714435>
- van der Sman R. G. M. and J. R. Bows (2017)** Critical factors in microwave expansion of starchy snacks. *Journal of Food Engineering* 211:69-84, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.05.001>
- Valadez-Gutiérrez J., N. O. Gómez-Montiel, R. E. Preciado-Ortíz, C. A. Reyes-Méndez y A. Peña-Ramos (2014)** V460P, variedad de maíz palomero para la región de Las Huastecas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7 (Especial):1303-1308, <http://doi/10.29312/remexca.v0i7.1112>
- Vázquez-Carrillo M. G., D. Santiago-Ramos y J. D. Figueroa-Cárdenas (2019)** Kernel properties and popping potential of Chapalote, a Mexican ancient native maize. *Journal of Cereal Science* 86:69-76, <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.01.010>
- Wellhausen E., L. M. Roberts, E. Hernández X. y P. C. Mangelsdorf (1951)** Razas de maíz en México, su origen, características y distribución. Folleto Técnico no.5. Oficina de Estudios Especiales, Secretaría de Agricultura y Ganadería. México, D. F. 237 p.
- Ziegler K. E. (2001)** Popcorn. In: Hallauer A. R. (ed.) Specialty Corns. Second ed. CRC Press. Boca Raton, FL. pp:199-234.
- Zou C., P. Wang and Y. Xu (2016)** Bulked sample analysis in genetics, genomics and crop improvement. *Plant Biotechnology Journal* 14:1941-1955, <https://doi.org/10.1111/pbi.12559>

CAPÍTULO I. CAPACIDAD DE REVENTADO EN SEGREGANTES F₂ DE CRUZAS BIPARENTALES ENTRE LÍNEAS DE MAÍZ PALOMERO × NO PALOMERO

1.1. Resumen

La característica comercial más importante en el maíz palomero, es el volumen de expansión del almidón contenido en el endospermo. Sin embargo, no se han realizado estudios que evalúen la influencia de cada tipo de endospermo sobre este carácter cuando se cruza con maíz palomero. Los objetivos del presente estudio fueron: 1) analizar los patrones de segregación en las poblaciones F₂ derivadas de siete cruzas entre una línea palomera × líneas con endospermo contrastante, 2) determinar la craza más apropiada para futuros estudios moleculares en la búsqueda de marcadores relacionados con la capacidad de reventado y 3) determinar el número de genes relacionados con el volumen de expansión. Un total de 3351 individuos F₂ derivados de las siete cruzas biparentales, fueron fenotipados para los caracteres morfológicos: volumen de expansión, forma de palomita y porcentaje de granos no reventados. Los patrones de segregación fueron evaluados con los parámetros de amplitud fenotípica, asimetría y curtosis así como la prueba no paramétrica de medianas, Kruskal-Wallis o prueba de H. La validación del número de genes se realizó con la formula $(1/4)^n$ y se validó con la prueba X^2 . Se observó segregación transgresiva en todas las poblaciones, probablemente inducida por el fenómeno de recombinación meiótica, lo que hizo posible la combinación de alelos favorables o no en individuos F₂, expresando un volumen de expansión más alto o más bajo que los parentales. La prueba de H y el análisis de los patrones de segregación indicaron que la población F₂ con endospermo cristalino derivada de la craza CML561 × CML558 fue la más divergente en los caracteres relacionados con la capacidad de reventado y, por lo tanto, la población más adecuada para continuar con el análisis molecular en busca de marcadores asociados al volumen de expansión. Se estimó un número de cuatro a cinco genes involucrados en el volumen de expansión.

Palabras clave: *Zea mays* L., volumen de expansión, genes, maíz palomero, segregación transgresiva.

CHAPTER I: POPPING CAPACITY IN F₂ SEGREGANTS OF BIPARENTAL CROSSES BETWEEN POPCORN × NON-POPCORN MAIZE

1.1. Abstract

The most important commercial trait in popcorn is the popping expansion of the starch contained in the endosperm. However, no studies have been conducted to evaluate the influence of each kind of endosperm on this trait when crossed with popcorn. The aims of the present study were 1) to analyze the segregation patterns in F₂ populations derived from seven crosses between a popcorn × contrasting endosperm lines, 2) to determine the most appropriate cross for future association studies to identify popping-related-markers and 3) to estimate the number of genes popping-expansion-related. A total of 3351 F₂ individuals derived from the seven biparental crosses were phenotyped for morphological traits: popping expansion, flake shape and unpopped kernels. The segregation patterns were evaluated with the phenotypic amplitude, asymmetry and kurtosis parameters as well as Kruskal-Wallis or H test non-parametric median test. The number of genes was estimate with $(1/4)^n$ and validated with χ^2 test. A transgressive segregation was observed in all populations, probably induced by the meiotic recombination phenomenon which made possible the combination of favorable alleles or not in F₂ individuals expressing a popping expansion higher or lower than the parental ones. The segregation patterns analysis and the H test indicated that the F₂ population with flint endosperm derived by CML561 × CML558 cross, was the most divergent in morphological traits and therefore the appropriate population to continue with a molecular analysis to found molecular markers associate with popping expansion in a more precise way. A number of four to five genes popping-expansion-related was estimated.

Keywords: *Zea mays* L., popping expansion, genes, popcorn, transgressive segregation.

1.2. Introducción

Las palomitas de maíz son la botana más antigua y la más popular a nivel mundial y su consumo va en aumento, en México el consumo de maíz palomero es de 65 mil t año⁻¹, de las cuales sólo se producen 1.6 mil t año⁻¹ (SIAP, 2017), por lo que el 98 % del volumen restante se importa principalmente de EE.UU. y en menor proporción de Argentina (SIAVI, 2017). La escasa producción de este grano a nivel nacional, a pesar de ser su centro de origen, se debe a la inexistencia de programas de mejoramiento genético, razón por la cual no se han desarrollado variedades adaptadas a las condiciones agroclimáticas en las que se cultivan las razas mexicanas y los pocos intentos de producir variedades nacionales han utilizado como base genética líneas palomeras de EE.UU. (Valadez-Gutiérrez *et al.*, 2014).

La poca selección de las razas palomeras mexicanas, para la producción de palomitas queda evidenciada en un estudio realizado por Santacruz-Varela *et al.* (2004), en el cual compararon el volumen de expansión del grano entre muestras de razas mexicanas de maíz palomero y un grupo perteneciente a la raza North American Yellow Pearl, el resultado obtenido fue una relación de expansión de 1:24 a favor de la raza Norteamericana (48.8 vs. 1 166 cm³ 30 g⁻¹).

Se ha hipotetizado que la capacidad de reventado en maíz para formar palomitas, es un carácter cuantitativo, de tipo aditivo y que está condicionado por cuatro a cinco genes de efectos mayores (Ashman, 1983; Ziegler, 2001); otros autores postulan que este carácter está controlado por tres a cuatro genes de efectos mayores (Lu *et al.*, 2003); sin embargo, estos estudios no mencionan la metodología utilizada para afirmar lo anterior; aunado a ello son pocos los estudios que abordan la genética del carácter.

Por otro lado, el uso de marcadores moleculares como herramienta para auxiliar al mejoramiento genético convencional podría utilizarse en el mejoramiento de las razas de maíz palomero para identificar regiones específicas del genoma involucradas en el carácter cuantitativo de interés (QTL), ello simplifica el proceso analítico, reduce el tiempo y costos del análisis de las poblaciones y posibilita el uso de marcadores de alta densidad como los SNP.

Algunos estudios han involucrado al maíz dentado como uno de los parentales en la construcción de las poblaciones para un análisis genético, pero los esfuerzos para desentrañar información sobre la capacidad del maíz cristalino no palomero y otros tipos de endospermo harinoso como el maíz semidentado para contribuir a un mayor volumen de expansión han sido limitados (Babu *et al.*, 2006; Coan *et al.*, 2019; Robbins y Ashman, 1984).

Los estudios con marcadores moleculares para detección de regiones genómicas involucradas en la capacidad de reventado y su eventual uso en selección asistida, contemplan la formación de cruza biparentales entre maíz palomero y otro maíz con endospermo contrastante para obtener poblaciones segregantes y usarlas para determinar relaciones de causalidad entre marcadores y caracteres fenotípicos; sin embargo, existe una amplia diversidad de tipos de endospermo diferentes al palomero, por lo que es importante definir el tipo de endospermo que generé una población apropiada para la selección de individuos en las dos colas de la distribución fenotípica ya que esta metodología proporciona una alternativa rentable al análisis de toda la población para el genotipo selectivo que haga posible el mapeo genético del fenómeno de reventado en maíz palomero (Sun *et al.*, 2010).

Se sabe que algunas características físicas y morfológicas del grano como tamaño, disposición cristalina en el endospermo, dureza, relación amilosa/amilopectina, un mayor empaquetamiento fibrilar en el pericarpio, porosidad, contenido de humedad y proteínas del endospermo y del pericarpio, influyen de manera decisiva en el reventado y la formación de palomitas en los maíces palomeros (Borras *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2015; Ertaş *et al.*, 2008; Gökmen, 2004; Hoseney *et al.*, 1983; Park *et al.*, 2000).

Lo anterior pone de manifiesto que hacen falta estudios que aborden la influencia de los diferentes tipos de endospermo sobre los caracteres de mayor interés en cruza con maíz palomero que produzcan patrones de segregación que expongan de manera más clara las bases genéticas que determinan la capacidad de reventado del maíz palomero, por lo que el presente estudio tuvo como objetivos: 1) analizar los patrones de segregación en las poblaciones F₂ derivadas de siete cruza entre maíz palomero × no palomero, 2) determinar la cruza más apropiada para futuros estudios moleculares en la búsqueda de marcadores relacionados con la capacidad de reventado y 3) determinar el número de genes relacionados con el volumen de expansión.

1.3. Materiales y métodos

1.4.1 Obtención de las poblaciones de análisis

Se utilizaron ocho CMLs (CIMMYT Maize Lines) adaptadas a Valles Altos (Cuadro 1), facilitadas por el Banco de Germoplasma de Maíz del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (<http://hdl.handle.net/11529/10246>). La línea CML561 fue seleccionada, mediante pruebas de reventado, como la línea parental femenina, ya que mostró un volumen de expansión superior al resto de las líneas evaluadas.

Cuadro 1.1. Descripción de las CMLs adaptadas a Valles Altos, utilizadas como parentales para formar siete cruzas.

Línea	ID	DMF [†]	DFP ^{††}	TE	VE (cm ³ 30g ⁻¹)
CML240	18199	80	86	Semidentado	65
CML246	18204	85	90	Semidentado	95
CML457	25781	88	90	Dentado	118
CML459	25783	84	89	Semidentado	67
CML461	25785	84	85	Dentado	96
CML527	27451	81	86	Semidentado	135
CML558	28117	90	94	Cristalino	215
CML561	28120	89	91	Palomero	460

ID: Registro en el Banco de Germoplasma; VE: Volumen de Expansión. [†]DMF y ^{††}DFP: Los datos corresponden al promedio de los días a floración registrados en los ciclos: P-V, 2016 y P-V, 2017 en la localidad de COLPOS- Montecillo, así como los datos reportados en la base de datos del MGB del CIMMYT.

1.4.2. Obtención de la población de análisis F₂

Durante el ciclo Primavera-Verano (P-V) 2015, en la estación experimental del CIMMYT ubicada en Metepec, Estado de México, en el Valle de Toluca con una altitud de 2,670 metros, en el paralelo 19°15'00" latitud Norte y 99°36'10" longitud Oeste (EMM, 2018). En esta localidad se formaron las cruzas biparentales de estas líneas, para lo cual se establecieron los parentales sembrando 110 semillas de cada línea de maíz, repartidas en parcelas de siete surcos de 5.0 m de largo por 0.8 m de ancho, con una distancia de siembra de 0.50 m. Las cruzas biparentales se realizaron mediante polinizaciones planta a planta.

Los ciclos P-V de 2016 y 2017 se llevaron a cabo en el campo experimental del Colegio de Postgraduados (COLPOS) ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México, con una altitud de 2,250 metros, en el paralelo 19°23'40" latitud Norte y 98°39'28" longitud Oeste (EMM, 2018). En el ciclo P-V de 2016 se sembraron 600 semillas de cada población F₁, repartidas en parcelas de 20 surcos de 9.0 m de largo por 0.8 m de ancho, con una distancia de siembra de 0.30 m, en las cuales se realizó una polinización manual mediante autofecundaciones para obtener la población F₂.

En el ciclo P-V de 2017, se sembraron, 600 semillas de cada población F₂ repartida en parcelas de 20 surcos de 9.0 m de largo por 0.8 m de ancho, con una distancia de siembra de 0.30 m y se autofecundaron para incrementar las poblaciones segregantes, las cuales constituyeron las poblaciones de análisis, en este ciclo se sembraron los parentales con el fin de fenotiparlos. En cada ciclo agrícola se aplicaron las labores culturales propias del cultivo y de la zona.

1.4.3. Fenotipo de segregantes F₂

Las poblaciones de análisis se cosecharon en el ciclo P-V de 2017, una vez que llegaron a madurez fisiológica, con un contenido de humedad de 16 ± 2 %, cada mazorca F₂ se identificó con una etiqueta y se almacenaron en un cuarto a temperatura ambiente. Se tomó una muestra de 30 g de cada mazorca y se colocaron en una cámara de ambiente controlado (CONVIRON S10H, Serie 970106, Winnipeg, Manitoba, Canadá) a una temperatura de 21 °C al 70 % de humedad relativa durante 30 días donde alcanzaron un porcentaje de humedad de 13.5 ± 0.5 %.

Para la evaluación de los caracteres morfológicos se siguió la metodología desarrollada por The Iowa State University Popcorn Program, la cual consiste en reventar la muestra en un horno de microondas convencional colocando la muestra en una bolsa de papel de estraza de 250 cm³ de capacidad, realizando dobleces para evitar la salida de los granos reventados la cual se introdujo en un horno de microondas convencional de 1000 W (DAEWOO KOR-164HL, México) por un tiempo de 2:45 min al 70 % de potencia (Ziegler, 2001).

1.4.4. Caracteres evaluados

- Volumen de expansión (VE). Para cada población, las muestras se tomaron al azar y se sometieron a las condiciones de reventado descritas. Se midió el volumen total del grano reventado en cm^3 30g^{-1} y se realizó un ajuste restando el volumen de los granos antes de reventar.
- Forma de la palomita. Se obtuvo mediante una escala visual del 1 al 5, asignando el valor de 1 a una expansión redondeada (hongo), 3 a una expansión bilateral y 5 a una expansión multilateral (mariposa).
- Porcentaje de granos no reventados (GNR). Se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{GNR} = \frac{\text{Peso de granos no reventados (g)}}{\text{Peso total de muestra reventada (g)}} \times 100$$

1.4.5. Análisis estadístico

Se analizó la capacidad de reventado de cada cruce biparental a través del carácter VE, realizando una prueba gráfica de normalidad y de distribución de frecuencias fenotípicas para observar la simetría de las distribuciones y detectar la población con el intervalo intercuartílico más amplio (Sun *et al.*, 2010). El cálculo para detectar las diferencias entre tipos de endospermo para los caracteres evaluados, se obtuvo a través de la prueba no paramétrica de comparación de medianas Kruskal-Wallis o prueba de H con un nivel de significancia $\alpha=0.05$, la cual no asume normalidad en los datos, así como del análisis del peso combinado de las colas con respecto a la media (K) y el coeficiente de asimetría de Fisher (AsF). Se utilizó el software R (versión 3.5.3) con la paquetería “agricolae” (<https://CRAN.Rproject.org/package=agricolae>).

La estimación del número de genes involucrados en el VE se realizó mediante la fórmula logarítmica para un carácter poligénico $(1/4)^n$, donde n es igual al número de genes involucrados en el carácter de interés, este valor denota la frecuencia de la clase fenotípica con igual nivel de expresión que el parental superior (Beadle, 1939). Posteriormente y a manera de validación, se realizó la prueba de Ji-cuadrada (X^2) con los datos fenotípicos de cada población. Para el valor de tablas (X^2) se usaron n-1 grados de libertad, donde n es el número de grupos de clasificación de las frecuencias esperadas con un nivel de significancia $\alpha=0.05$. Las frecuencias fenotípicas esperadas se estimaron de manera empírica con la fórmula de la distribución binomial acumulativa, lo cual permitió realizar agrupaciones de los fenotipos, quedando de la siguiente manera: G1: individuos homocigotos con un VE similar al P1; G2: individuos homocigotos con

un VE similar al del P2; G3: individuos heterocigotos con VE intermedio, igual y superior al P1 para detectar segregación transgresiva (García-León *et al.*, 2018). Se formuló la hipótesis para la prueba de X^2 bajo el supuesto de que la capacidad de reventado en maíz palomero está condicionada por tres a cinco genes de efectos aditivos con el mismo efecto bajo una segregación mendeliana de 1:2:1 esperada en una F_2 (Ashman, 1983; Babu *et al.*, 2006; Coan *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2003, Ziegler, 2001); de esta forma, la hipótesis se probó con las frecuencias esperadas para tres hasta seis genes posibles; por ejemplo, si la capacidad de reventado estuviera condicionada por tres genes, la frecuencia esperada de individuos homocigotos iguales al parental palomero sería de 1/64 (1.6 % de los individuos).

1.4. Resultados y discusión

1.5.1 Análisis de los patrones de segregación

Los patrones de segregación de las poblaciones F_2 de siete cruzas de maíz palomero \times no palomero, agrupadas por tipo de endospermo con su respectiva prueba gráfica de normalidad para el carácter VE, se muestran en las Figuras 1.1, 1.2, 1.3 y 1.4. La distribución mostró diferencias en cuanto a longitud y peso de las colas, así como individuos extremos que superan a los parentales; es decir, se observó segregación transgresiva.

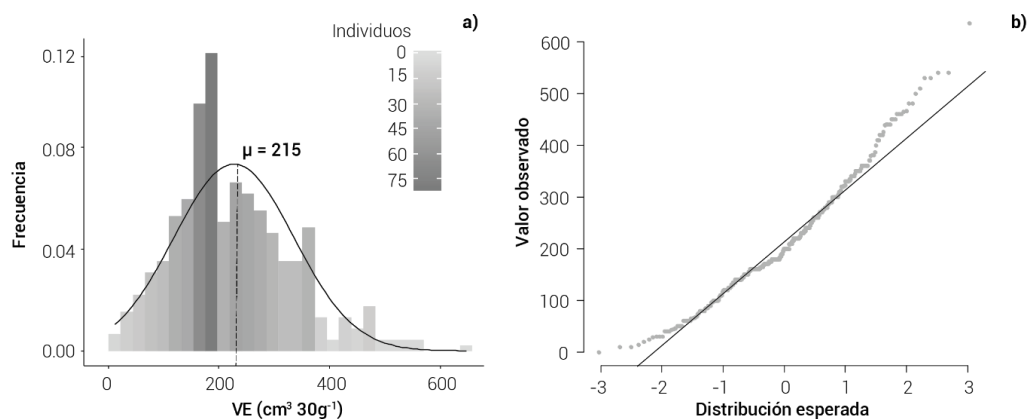


Figura 1.1. Frecuencia fenotípica (a) y prueba de normalidad grafica (b) para el carácter VE evaluado en la población F_2 derivada de la cruce biparental CML561 \times CML558, con endospermo cristalino.

Existen diferencias apreciadas en el VE en función del tipo de endospermo, ello indica que el comportamiento del carácter está definido por varios genes de acción aditiva con diferentes efectos. Un factor importante para favorecer el VE hace referencia a una disposición más cristalina de la celulosa en el endospermo y la presencia de cuerpos proteicos compactos en las capas externas del mismo, es especial las α -zeinas (Borras *et al.*, 2006; Sweley *et al.*, 2013), pues intervienen directamente en el reventado y la formación de las palomitas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos, pues la cruce de endospermo cristalino presentó un mayor VE (Figura 1.1), que en las cruces con endospermo dentado y semidentado (Figuras 1.2, 1.3 y 1.4), debido principalmente al arreglo poligonal del almidón (Babu *et al.*, 2006; Borras *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2015; Hosoney *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2000).

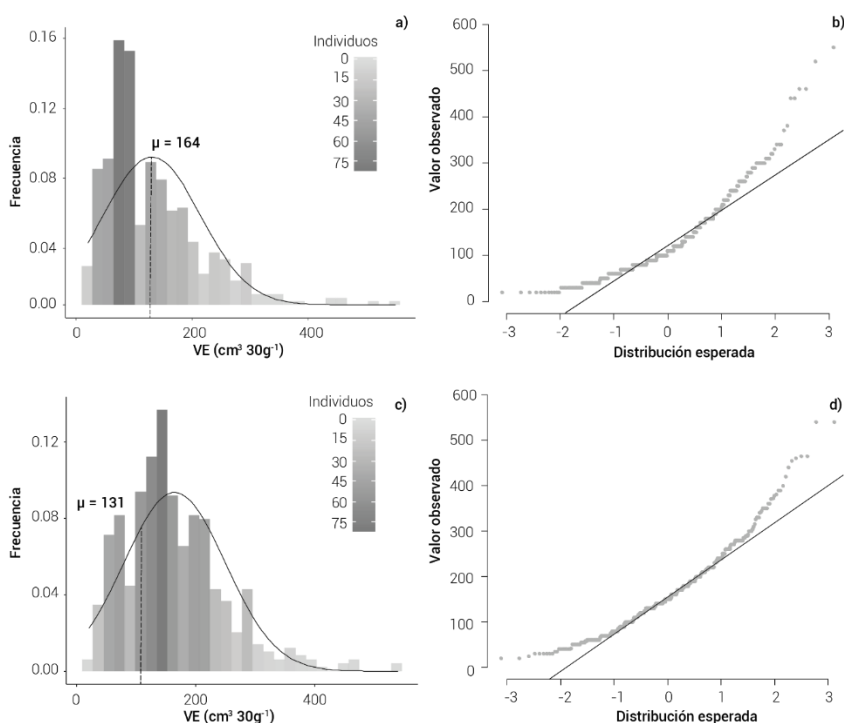


Figura 1.2. Frecuencia fenotípica y prueba de normalidad gráfica para el carácter VE evaluado en las poblaciones F₂: CML561 × CML461 (a, b); CML561 × CML457 (c, d), con endospermo dentado.

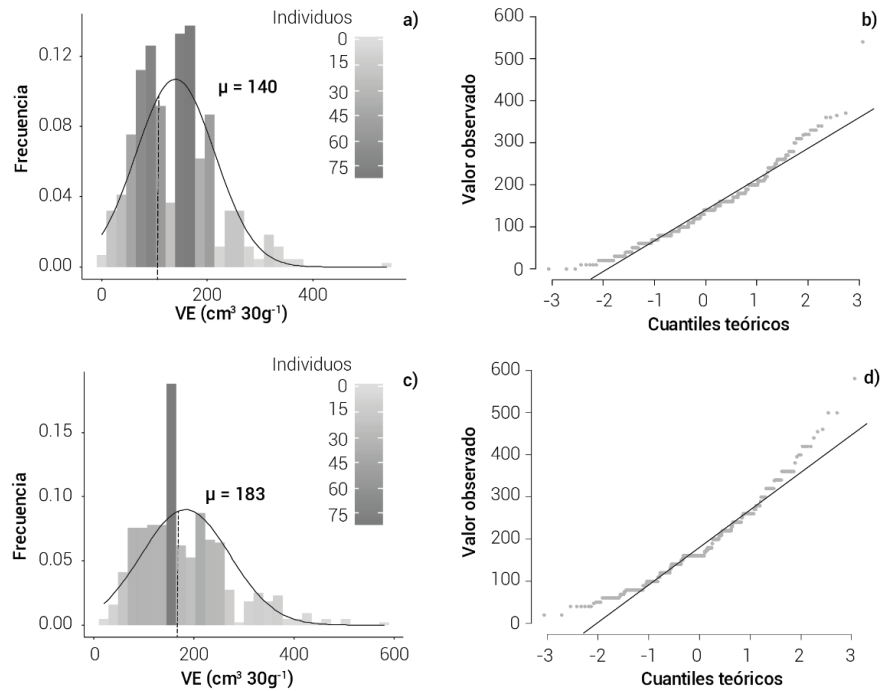


Figura 1.3. Frecuencia fenotípica y prueba de normalidad grafica para el carácter VE evaluado en las poblaciones F₂: CML561 × CML240 (a, b); CML561 × CML246 (c, d), con endospermo semidentado.

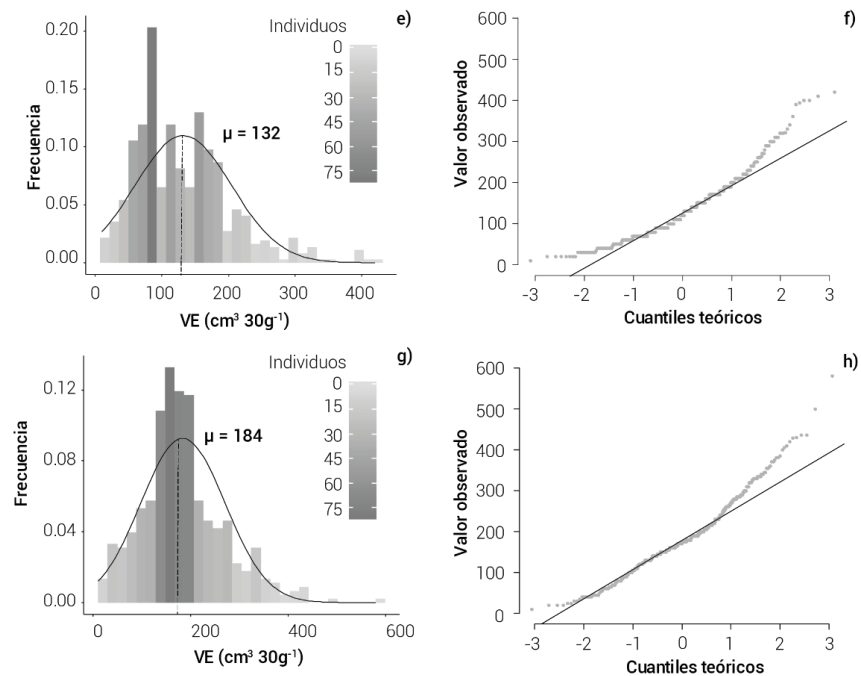


Figura 1.4. Frecuencia fenotípica y prueba de normalidad grafica para el carácter VE evaluado en las poblaciones F₂: CML561 × CML459 (e, f); CML561 × CML527 (g, h), con endospermo semidentado.

En otros estudios se ha demostrado que el pericarpio y el almidón son factores importantes para el proceso de reventado, debido a las propiedades físicas de cada uno en cuanto a la capacidad de transferir calor, siendo el pericarpio en maíces palomeros 2.9 veces más eficiente en la difusión de calor dentro del grano y por la estructura del almidón cristalino, presenta dos veces mayor conductividad que en maíces no palomeros (daSilva *et al.*, 1993; Hoseney *et al.*, 1983). En cuanto al pericarpio (hemicelulosa, celulosa y pectinas), experimentará la transición de cristales en la gelatinización antes de la expansión del almidón (Gökmen, 2004), por ello se debe considerar la resistencia mecánica; que en maíces palomeros es aproximadamente cuatro veces mayor que en maíces no palomeros, lo que significa que estos granos pueden soportar la presión requerida (9.2 atmósferas) para favorecer los procesos de nucleación (equilibrio dinámico del agua contenida en las células), apertura celular, ruptura y contracción que se presenta al aumentar la temperatura (180°C) lo cual provoca la formación de la palomita (Mishra *et al.*, 2014; Sweley *et al.*, 2013; van der Sman y Bows, 2017).

En cuanto a la segregación transgresiva observada en todas las poblaciones segregantes, se sabe que es más común en poblaciones segregantes de híbridos biparentales que en poblaciones silvestres, la explicación más aceptada para ello es que existen alelos complementarios de efectos aditivos en ambos parentales con efectos opuestos dentro de las líneas y que difieren de las frecuencias fenotípicas predichas de los parentales (Rieseberg *et al.*, 1999). Existen casos en los que la segregación transgresiva es el resultado de alelos recesivos raros, esto es más evidente en cruza interespecíficas.

Asumiendo la teoría sobre genes complementarios, una de las predicciones es que la complementariedad se construye más fácilmente en poblaciones autógamias o líneas, que en poblaciones alógamas, es por ello que cuando se hace una cruce biparental, los individuos transgresivos se observan en la F₂, como se presentó en las poblaciones evaluadas en este estudio, lo cual concuerda con otra predicción que sugiere que la transgresión está correlacionada positivamente con la divergencia entre los parentales utilizados en la formación de un híbrido simple, una explicación alternativa es que la heterosis juega un papel importante en este efecto e implica la sobredominancia o la dominancia parcial de un locus en individuos heterocigotos como una segunda causa probable de la segregación transgresiva (Rieseberg *et al.*, 1999).

Una explicación adicional para la presencia de segregación transgresiva en todos los grupos de segregantes es que posiblemente todas las poblaciones poseen alelos favorables para reventado y que la diferencia radica en la frecuencia de éstos, siendo mayor en los maíces palomeros que en aquellos con diferente tipo de endospermo, los cuales para exhibir capacidad de reventado requieren de un umbral mínimo en la frecuencia de alelos favorables, es por ello que los segregantes comienzan a mostrar capacidad de reventado con magnitudes relativamente altas. La baja frecuencia que aquí se postula de alelos favorables presentes en las líneas no palomeras no permite alcanzar el umbral de reventado a las líneas *per se* y a una proporción considerable de segregantes de la cola izquierda de la distribución; y en el sentido opuesto, en la cola de la derecha el fenómeno de recombinación meiótica posibilita la conjunción de alelos favorables en los individuos segregantes F₂ con frecuencias arriba de las del parental palomero, induciendo así la referida segregación transgresiva.

1.5.2. Volumen de Expansión (VE)

En el Cuadro 2 se presenta la prueba H, coeficiente de asimetría de Fisher y nivel de curtosis, para los caracteres evaluados en poblaciones segregantes F₂ de siete cruzas de maíz palomero × no palomero. La prueba de H mostró que la craza CML561 × CML558 con endospermo cristalino presentó superioridad estadística en la mediana con respecto a las demás cruzas, así mismo mostró una media superior (215 cm³ 30g⁻¹), seguida de las cruzas CML561 × CML527 (183.93 cm³ 30g⁻¹) y CML561 × CML246 (183.20 cm³ 30g⁻¹) ambas con endospermo semidentado. La craza CML561 × CML457 presentó inferioridad estadística de acuerdo a la prueba de H y a la media del VE (130.65 cm³ 30g⁻¹).

Los resultados obtenidos difieren de lo reportado por Robbins y Ashman (1984), quienes evaluaron la correlación entre VE y el tipo de endospermo en cruzas de maíz palomero × dentado y palomero × cristalino, concluyendo que, ambos tipos de cruzas presentaron rangos de expansión similares y sugieren que el VE podría recuperarse fácilmente. En cuanto a la influencia del endospermo dentado, Dofing *et al.* (1990) determinaron la heredabilidad del VE y los componentes del rendimiento, en dos cruzas de maíz palomero × dentado. Sus resultados demuestran que los efectos genéticos de dominancia dieron un mayor rendimiento de grano, pero un VE más bajo en estas cruzas, lo cual concuerda con nuestros resultados.

Un factor a considerar es que el endospermo opaco tiene grandes gránulos de almidón con muchas bolsas de aire entre ellos y por ello no expande ni se gelatiniza ya que el vapor se escapa y la presión disminuye, mientras que el endospermo cristalino tiene gránulos densamente empacados, los cuales permiten que gelatinice y se expanda en forma de palomita (Hoseney *et al.*, 1983); así mismo, los cultivares que muestran buen reventado tienen un alto nivel de amilosa (27 %) contenida en el almidón (Mishra *et al.*, 2014; Sweley *et al.*, 2013). Lo anterior concuerda con los resultados de Babu *et al.* (2006), quienes evaluaron una cruce de maíz palomero × cristalino, para aportar información sobre la influencia de este tipo de endospermo en el incremento del VE y reportaron que en el endospermo cristalino existen cuatro QTL con efectos aditivos que explican el 62 % de la varianza fenotípica, entonces, estas poblaciones podrían emplearse en programas de retrocruzamiento o de selección recurrente (Vieira *et al.*, 2016).

En un estudio reciente Coan *et al.* (2019), evaluaron tres cruces biparentales de maíz palomero × maíz con endospermo cristalino en cuatro generaciones (F₁, F₂, BC₁-Palomero, BC₁-Cristalino), reportando que el VE está controlado por dos tipos de herencia: un gen de efectos mayores, junto con genes menores de efecto aditivo y genes menores de efecto dominante.

Los resultados reportados en este trabajo sugieren que aunque las líneas con endospermo dentado y semidentado no superaron a la cruce de las líneas palomero × cristalino, es razonable pensar que poseen alelos favorables de efecto aditivo, ello se refleja en los individuos transgresivos presentes en todas las poblaciones, así mismo se asume que el endospermo cristalino posee una mayor frecuencia de alelos favorables que al cruzarse con la línea palomera estos genes confieren una ganancia en la expresión del carácter.

1.5.3. Forma de la palomita

La prueba de H mostro que la cruce con endospermo cristalino fue superior estadísticamente con una forma más tendiente al tipo mariposa, no así para la cruce CML561 × CML457 y CML561 × CML240 de endospermo semidentado y dentado, respectivamente. La expansión multilateral o de tipo mariposa fue más común en el endospermo cristalino y la expansión bilateral en las poblaciones de endospermo harinoso. La forma de las palomitas determinó en gran parte el VE, debido al espacio que ocupan las palomitas en el contenedor; es además un factor importante para su empaquetamiento, debido a que de ello depende el número de piezas por contenedor y el destino de la producción, pues se prefieren reventados tipo hongo para la

industria y tipo mariposa para la distribución en cines y tiendas comerciales para el consumo en los hogares, por la fragilidad de las palomitas (Sweley *et al.*, 2013; Ziegler, 2001).

1.5.4 Porcentaje de granos no reventados (GNR)

La prueba de H mostro un mayor GNR en las cruzas CML561 × CML558 y CML561 × CML457 con endospermo cristalino y dentado, lo cual hace referencia a un carácter no deseado en estas poblaciones. La cruza con endospermo dentado también presentó el menor VE, lo cual demuestra su poca capacidad de expansión, de acuerdo con lo que se esperaba, pues los caracteres tienen una correlación negativa. En el caso de la cruza cristalina la situación fue diferente, pues ésta presentó el VE más alto; una posible explicación es que una vez que han reventado los granos, éstos bloquean el paso del calor hacia los granos que están comenzando a calentarse, por lo que dichos granos no alcanzan la temperatura óptima para completar dicho proceso (van der Sman y Bows, 2017). El mayor GNR se presentó en la cruza con endospermo cristalino (18 %), en las cruzas con endospermos dentado y semidentado este porcentaje fue menor al 13 %. En estudios fisicoquímicos se ha demostrado que el GNR y el VE están relacionado con el nivel de zeínas (α -zeínas), ácido linoleico y amilosa lixiviada, complejo que contribuye a la rigidez de las membranas, lo que permite mayores presiones (Borras *et al.*, 2006).

1.5.5 Asimetría de Fisher y nivel de curtosis

Al evaluar la distribución de las poblaciones con respecto a la media se observa que el VE y GNR, presentaron asimetría positiva; es decir, el peso de la cola derecha fue superior y distante de la media, no así para forma que presento asimetría negativa, con un peso de la cola izquierda superior a la media. El nivel de curtosis reveló valores positivos en la mayoría de los caracteres y tipos de endospermo, lo que implica que el peso de las colas fue mayor que en una distribución normal, excepto en forma, con valores inferiores en las cruzas con maíz dentado y semidentado. El coeficiente de curtosis más alto se presentó en las poblaciones con endospermo dentado, con una distribución leptocúrtica; es decir, con el mayor número de individuos en la región central de la distribución y el coeficiente más bajo se presentó en la población con endospermo cristalino, con una distribución platicúrtica; es decir, una baja concentración de individuos en la región central. La asimetría y niveles de curtosis diferentes a cero se deben al efecto de los individuos transgresivos, lo cual se hace evidente al observar la distribución intercuartil.

Cuadro 1.2. Caracteres morfológicos evaluados en el grano y las palomitas de siete poblaciones F₂ derivadas de las cruzas entre el progenitor palomero CML561 × progenitores no palomeros.

Cruza	Volumen de Expansión (cm ³ 30g ⁻¹)				Forma de Palomita				GNR (%)			
	Media	AsF	K		Media	AsF	K		Media	AsF	K	
CML561 × CML240	139.80 ± 74.63	d	0.91	1.77	2.71 ± 1.38	d	0.20	-1.20	12.00 ± 15.70	b	2.70	8.41
CML561 × CML246	183.20 ± 88.80	b	0.94	1.30	3.12 ± 1.30	c	-0.07	-0.89	9.01 ± 13.18	c	2.90	10.11
CML561 × CML457	130.65 ± 83.50	e	1.50	3.08	2.73 ± 1.42	d	0.19	-1.34	12.44 ± 12.00	a	2.14	6.80
CML561 × CML459	132.20 ± 73.00	de	1.08	1.52	3.00 ± 1.53	c	-0.03	-1.40	9.34 ± 10.28	b	2.80	10.40
CML561 × CML461	164.40 ± 85.40	c	1.04	1.73	3.52 ± 1.22	b	-0.35	-0.81	10.37 ± 12.40	b	3.00	12.11
CML561 × CML527	183.93 ± 86.09	b	0.79	1.21	3.63 ± 1.11	b	-0.60	0.30	8.81 ± 10.00	b	3.00	14.00
CML561 × CML558	215.40 ± 108.71	a	0.70	0.54	4.01 ± 1.15	a	-1.16	0.46	18.31 ± 22.03	a	1.73	2.42

GNR: Porcentaje de granos no reventados; AsF: Coeficiente de asimetría de Fisher; K: nivel de curtosis. Media (± SD). Prueba de medianas, letras iguales no son estadísticamente diferentes ($H_{\alpha=0.05}$).

1.5.6. Número de genes que condicionan el VE en las cruzas biparentales evaluadas

En el Cuadro 3 se muestra la prueba X^2 de las siete cruzas palomero \times no palomeros y la estimación del número de genes. Bajo el supuesto de que el VE está condicionado por 3, 4, 5, y 6 genes mayores de efectos aditivos y que todos los genes tienen el mismo efecto, el número de genes que definen el VE en las poblaciones F_2 evaluadas varía de cuatro a cinco, lo cual indica que se trata de un carácter que está controlado por relativamente pocos genes, probablemente de efectos aditivos, lo que concuerda con lo reportado en otras investigaciones (Ashman, 1983; Coan *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2003, Ziegler, 2001).

En estudios genómicos realizados por Babu *et al.* (2006) y Dong *et al.* (2015) se reportaron cuatro regiones genómicas asociadas al volumen de expansión, lo cual concuerda los resultados de la presente investigación. Otros estudios reportan algunos genes candidatos que están implicados en la síntesis de polisacáridos de almidón, ácido linoleico, amilosa, proteínas de almacenamiento α -zeinas, lípidos y pared celular, relaciones que difieren entre los tipos de endospermo en maíz, pero que incrementan el VE (Paes *et al.*, 2016), lo que sugiere que los pocos genes involucrados sean quizás de acción pleiotrópica en características morfológicas del grano y del endospermo.

Se debe considerar que los caracteres evaluados son complejos y están afectados por otros factores como el método de reventado utilizado (olla con aceite, horno de microondas, aire caliente, arena), tamaño, volumen y contenido de humedad del grano, genotipo, procedimiento de secado, cantidad de daño en el pericarpio y endospermo, entre otros (Allred-Coyle *et al.*, 2002; Ertaş *et al.*, 2008; Gökmen, 2004; Hosney *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 2007; Ziegler, 2001), lo que apunta hacia una herencia multifactorial, además de que hay características ambientales que modifican la expresión del VE, por lo que su estudio es más complejo; sin embargo, las estimaciones de heredabilidad alta (0.62 a 0.96) sugieren que el efecto ambiental es de menor peso, debido a que la heredabilidad está inversamente relacionada con la magnitud de los efectos ambientales sobre el rasgo (Gökmen, 2004; van der Sman y Bows, 2017).

Cuadro 1.3. Frecuencias fenotípicas observadas y esperadas de las poblaciones F₂ derivadas de las cruzas entre el progenitor palomero CML561 × progenitores no palomeros, de acuerdo a los grupos de clasificación.

Cruza	PM	G1		G2		G3		(1/4) ⁿ	X _c ²	Genes
	VE	E	O	E	O	E	O			
561 × 240	263	0	0	0	1	420	402	-	3.3	5
561 × 246	278	2	3	2	1	429	448	3.6	1.8	4
561 × 457	289	2	2	2	1	462	483	4.0	1.5	4
561 × 459	264	1	0	1	1	514	522	-	1.1	5
561 × 461	278	2	4	2	3	519	542	3.5	3.5	4
561 × 527	298	2	0	2	4	437	458	-	5.0	4
561 × 558	338	2	3	2	3	393	404	3.6	1.3	4

PM: parental medio (cm³ 30g⁻¹), E: frecuencia absoluta esperada, O: frecuencia absoluta observada, G1: individuos homocigotos con el mismo VE que el P1, G2: individuos homocigotos con el mismo VE que el P2, G3: individuos heterocigotos con VE intermedio, igual y superior al P1; 3 grados de libertad; $X_{t_{\alpha=0.05}}^2 = 5.991$.

1.6. Conclusiones

Los resultados indican que la población con la asimetría y el nivel de curtosis más cercanos a cero, así como la más divergente y por tanto más apropiada para estudios moleculares asociados a la capacidad de reventado en maíz palomero, es la población segregante derivada de la cruce biparental CML561 × CML558, con endospermo cristalino.

El número de genes que definen la capacidad de reventado en las poblaciones analizadas en este estudio, varía de cuatro a cinco genes.

1.7. Bibliografía

- Ashman R. B. (1983)** Popcorn. Plant disease control. Bulletin BP-4. *Historical Documents of the Purdue Cooperative Extension Service*. Purdue University, West Lafayette, Indiana EE.UU., <https://docs.lib.purdue.edu/agext/439>
- Allred-Coyle T.A. R. B. Toma, W. Reiboldt and M. Thakur (2002)** Effects of moisture content, hybrid variety, kernel size, and microwave wattage on the expansion volume of microwave popcorn. *International Journal of Food Science and Nutrition* 51:389-394, <https://doi.org/10.1080/096374800426984>
- Babu R., S. K. Nair, A. Kumar, H. S. Rao, P. Verma, A. Gahalain, I. S. Singh, and H. S. Gupta (2006)** Mapping QTLs for popping ability in a popcorn × flint corn cross. *Theoretical and Applied Genetics* 112:1392-1399, <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0242-1>
- Beadle G. W. (1939)** Teosinte branched1 and the origin of Maize. *Journal of Heredity* 30:245–247.
- Borras F., K. Seetharaman, N. Yao, J. L. Robutti, N. M. Percibaldi and G. H. Eyherabide (2006)** Relationship between popcorn composition and expansion volume and discrimination of corn types by using zein properties. *Cereal Chemistry* 83:86-92, <https://doi.org/10.1094/CC-83-0086>
- Coan M. M. D., R. J. B. Pinto, M. C. Kuki, A. T. do Amaral Júnior, A. S. T. Figueiredo, C. A. Scapim and M. Warburton (2019)** Inheritance Study for Popping Expansion in Popcorn vs. Flint Corn Genotypes. *Agronomy. Journal* 111:2174-2183, <https://doi.org/10.2134/agronj2019.04.0295>
- Da Silva W. J., B. C. Vidal M. E. Q. Martins, H. C. vargas, C. Pereira M. zerbetto and L. C. M. Miranda (1993)** What makes popcorn pop. *Nature* 362:417. <https://doi.org/doi:10.1038/362417a0>
- Dhliwayo T. 2008.** Genetic mapping and analysis of traits related to improvement of popcorn. Retrospective Theses and Dissertations. 15863. UMI Number:3296798, <http://lib.dr.iastate.edu/rtd/15863>

- Dofing S. M., M. A. Thomas-Compton and J. S. Buck (1990)** Genotype × popping method interaction for expansion volume in popcorn. *Crop Science* 30:62-65, <http://doi.org/10.2135/cropsci1990.0011183x003000010014x>
- Dong Y., Z. Zhang, Q. Shi, Q. Wang, Q. Zhou and Y. Li (2015)** QTL identification and meta-analysis for kernel composition traits across three generations in popcorn. *Euphytica* 204:649-660, <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1360-0>
- EMM, Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México (2018)** Estado de México, Municipios consultados: Texcoco y Metepec, <http://inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/municipios> (Agosto, 2019)
- Ertaş N., S. Soyulu and N. Bilgiçli (2008)** Effects of kernel properties and popping methods on popcorn quality of different corn cultivars. *Journal of Food Process Engineering* 32:478-496, <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2007.00228.x>
- García-León E., J. Huerta-Espino, H. E. Villaseñor-Mir, J. S. Sandoval-Islas, S. G. Leyva-Mir, I. Benítez-Riquelme y S. Cruz-Izquierdo (2018)** Genetics of resistance to stem rust in adult plant of elite genotypes of bread Wheat. *Revista Fitotécnica Mexicana* 41:385-392.
- Gökmen S. (2004)** Effects of moisture content and popping method on popping characteristics of popcorn. *Journal of Food Engineering* 65:357-362, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.01.034>
- Hoseney R. C., K. Zeleznak and A. Abdelrahman (1983)** Mechanism of popcorn popping. *Journal of Cereal Science* 1:43-52, [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(83\)80007-1](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(83)80007-1)
- Lee E. Y., K.I. Lim, J. K. Lim and S. T Lim (2007)** Effects of gelatinization and moisture content of extruded starch pellets on morphology and physical properties of microwave-expanded products. *Cereal Chemistry* 77:769-773. <https://doi.org/10.1094/cchem.2000.77.6.769>
- Li Y. L., Y. B. Dong, S. Z. Niu and D. Q. Cui (2007)** QTL for popping characteristics in popcorn. *Plant Breeding* 126:509-514, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01372.x>
- Li Y. L., Y. B. Dong, S. Z. Niu and D. Q. Cui (2009)** Identification of QTL for popping characteristics using a BC₂F₂ population and comparison with Its F_{2:3} population in popcorn. *Agricultural Sciences in China* 8:137-143, [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60020-1](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60020-1)
- Lu H. J., R. Bernardo and H. W. Ohm (2003)** Mapping QTL for popping expansion volume in popcorn with simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 106:423-427, <http://doi/10.1007/s00122-002-1041-y>
- Mishra G., D. C. Joshi and P. B. Kumar (2014)** Popping and puffing of cereal grains: a review. *Journal of Grain Processing and Storage* 1:34-46.
- Paes G. P., J. M. S Viana, F. F. E. Silva and G. B. Mundim (2016)** Linkage disequilibrium, SNP frequency change due to selection, and association mapping in popcorn chromosome regions containing QTLs for quality traits. *Genetics and Molecular Biology* 39:97-110, <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0126>
- Park D., K. G. D. Allen, F. R. Stermitz and J. A. Maga (2000)** Chemical composition and physical characteristics of unpopped popcorn hybrids. *Journal of Food Composition and Analysis* 13:921-934, <https://doi.org/10.1006/jfca.2000.0943>

- Rieseberg L. H., M. A. Archer and R. K. Wayne (1999)** Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity* 83:363-372, <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6886170>
- Robbins W. A. and R. B. Ashman (1984)** Parent-offspring popping expansion correlations in progeny of dent corn × popcorn and flint corn × popcorn crosses. *Crop Science* 24:119-121, <https://doi.org/10.2135/cropsci1984.0011183X002400010027x>
- Santacruz-Varela A., K. E. Ziegler, P. K. Bretting, M. P. Widrlechner, M. J. Millard and R. J. Salvador (2004)** Phylogenetic relationships among North American popcorns and their evolutionary links to Mexican and South American popcorns. *Crop Science* 44:1456-1467, <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1456>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2005-2018)** Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Producción de maíz palomero, Benjamín Franklin 146, Escandón, Miguel Hidalgo, Ciudad de México, México, <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Octubre, 2019).
- SIAVI, Sistema de Información Arancelaria Vía Internet (2005-2018)** Información de las Importaciones de maíz palomero. Capítulo 10059001, Insurgentes Sur 1940, Colonia Florida, Delegación Álvaro Obregón, Ciudad de México, México, <http://www.economia-snci.gob.mx/> (Octubre, 2019).
- Sun Y., J. Wang, J. H. Crouch and Y. Xu (2010)** Efficiency of selective genotyping for genetic analysis of complex traits and potential applications in crop improvement. *Molecular Breeding* 26:493–511, <https://doi.org/10.1007/s11032-010-9390-8>
- Sweley J. C., D. J. Rose and D. S. Jackson (2013)** Quality Traits and Popping Performance Considerations for Popcorn (*Zea mays* Everta). *Food Reviews International* 29:157-177, <https://doi.org/10.1080/87559129.2012.714435>
- Valadez-Gutiérrez J., N. O. Gómez-Montiel, R.E . Preciado-Ortíz, C. A. Reyes-Méndez y A. Peña-Ramos (2014)** V460P, variedad de maíz palomero para la región de Las Huastecas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7:1303-1308, <http://doi/10.29312/remexca.v0i7.1112>
- van der Sman R. G. M. and J. R. Bows (2017)** Critical factors in microwave expansion of starchy snacks. *Journal of Food Engineering* 211:69-84, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.05.001>
- Vieira R.A., R. Rocha, C.A. Scapim, A.T. Amaral Jr. and M. Vivas (2016)** Selection index based on the relative importance of traits and possibilities in breeding popcorn. *Genetics and Molecular Research* 15(2):gmr.15027719. <https://doi.org/10.4238/gmr.15027719>
- Ziegler K.E. (2001)** Popcorn. In: Hallauer A. R. (ed.) *Specialty Corns*. Second ed. CRC Press. Boca Raton, FL. pp: 199-234.

CAPÍTULO II. DETECCIÓN DE REGIONES DEL GENOMA DEL MAÍZ PALOMERO ASOCIADAS AL VOLUMEN DE EXPANSIÓN MEDIANTE ANÁLISIS DE SEGREGANTES EN MASA

2.1. Resumen

En los maíces palomeros mexicanos se ha hecho poca selección para el incremento del volumen de expansión (VE) y rendimiento. Las herramientas moleculares para asistir al mejoramiento genético son cada vez más accesibles, lo cual representa un apoyo en la selección de los individuos de interés. Los objetivos del presente estudio fueron: 1) detectar regiones genómicas asociadas al VE en una población F₂ derivada de la cruce biparental entre la línea palomera CML561 × CML558 de endospermo cristalino, siguiendo la metodología de análisis de segregantes en masa o BSA y 2) identificar marcadores moleculares y genes candidatos con efectos causales sobre el volumen de expansión. Un total de 100 individuos segregantes fueron seleccionados y agrupados en dos conjuntos contrastantes por VE de acuerdo con el análisis BSA. Los individuos se secuenciaron individualmente en la plataforma DArTseq, incluyendo las líneas parentales. Los datos genómicos fueron filtrados, eliminando SNP monomórficos y frecuencias del alelo menor inferiores al 5 % (MAF < 0.05), se seleccionó el 10 % efectivo de alelos, basado en la entropía de Shannon-Weaver (H= 0.10) resultando un total de 553 SNP polimórficos. El análisis de asociación se realizó con modelos lineales mixtos en ambos grupos con el programa GAPIT. Se realizó una búsqueda con de la herramienta básica de búsqueda de alineación local, con los diez marcadores más informativos. Las relaciones causales con el VE mostraron una alta correlación con la estructura de la población analizada. Los marcadores se ubicaron en los cromosomas: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 y 10. Los genes candidatos, en su mayoría estuvieron relacionados con la estructura de la pared celular, factores de transcripción, proteínas asociadas a la membrana y el complejo transportador transmembranal, lo que infiere que la pared celular y el pericarpio como parte estructural externa, son las estructuras físicas más influyentes del grano sobre el volumen de expansión en maíz palomero.

Palabras clave: *Zea mays* L., volumen de expansión, análisis de segregantes en masa, polimorfismos de nucleótido individual, análisis del genoma completo.

CHAPTER II. DETECTION OF GENOME REGIONS IN POPCORN ASSOCIATED WITH POPPING EXPANSION THROUGH BULK SEGREGANT ANALYSIS

2.2. Abstract

In Mexican popcorn landraces little selection has been made to increase the popping expansion (PE) and yield. Molecular tools to assist in genetic improvement are becoming more available, which represents a support tool for the selection of target individuals. The aims of the present study were: 1) to detect genomic regions popping-expansion-associated in a F₂ population derived from a biparental cross between the popcorn line CML561× CML558 flint endosperm line, following the bulk segregant analysis and 2) to identifying molecular markers and candidate genes with PE causal effects. A total of 100 segregating individuals were selected and grouped in two contrasting bulks by PE according to BSA those were sequenced individually on the DArTseq platform, including parental lines. Genomic data were filtered, eliminating monomorphic SNP and Minor Allele Frequencies less than 5 % (MAF < 0.05), effective 10 % SNP based on the Shannon-Weaver entropy was selected (H = 0.10), resulting in 553 polymorphic SNP. The association analysis was performed with Mixed-Linear-Models in both groups with the software GAPIT. A search was performed using the basic local alignment search tool with the top ten informative markers. The causal effects popping-expansion--related showed a high correlation with the population structure. The associate markers were located in Chromosomes: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 and 10. Candidate genes were related with the cell wall structure, transcription factors, membrane-associated-proteins and the transmembrane transporter complex, which suggesting that cell-wall and pericarp as external structural part of the kernel are the most influential physical structures popping-expansion-related.

Keywords: *Zea mays* L., popping expansion, Bulk Segregant Analysis, Single Nucleotide Polymorphisms, Genome-wide Association Study.

2.3. Introducción

El uso de herramientas moleculares para asistir al mejoramiento genético (Marker Assisted Selection) es cada vez más accesible, lo cual representa un ahorro en tiempo y recursos, al tratarse de una evaluación temprana y no destructiva de los genotipos en la búsqueda de genes que se expresan en determinadas etapas del desarrollo (Collard y Mackill, 2008). Dada la gran cantidad de marcadores disponibles y la velocidad de secuenciación, el costo es relativamente bajo, considerando que los polimorfismos de nucleótido individual o SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) son un tipo de marcador adecuado para el genotipo de calidad en cultivos (Semagn *et al.*, 2014).

Para ello, las tecnologías de Genotipo por secuenciación o GbS (Genotyping-by-sequencing) y DArTseq (Diversity Arrays Technology), han evolucionado como uno de los principales métodos de secuenciación, cada uno adaptado a diferentes aplicaciones; por ejemplo, el GbS (Elshire *et al.*, 2011) genera una densidad muy alta de marcadores (> 800 mil SNP), estos datos se utilizan de manera efectiva en estudios que emplean poblaciones estructuradas donde la imputación se implementa con alta precisión sobre los datos faltantes y es crítico en estudios que involucran una asociación amplia del genoma (GWAS). En contraste, la tecnología DArTseq (Sansaloni *et al.*, 2011) genera una menor densidad de marcadores (50 a 350 mil SNP) pero con una cobertura mucho mayor y niveles más bajos de datos faltantes ($\leq 20\%$) para el caso de maíz (Chen *et al.*, 2016); así mismo, son utilizados en muestras heterogéneas, la selección genómica y en estudios de diversidad.

En maíz palomero, las investigaciones con el uso de herramientas moleculares y bioinformáticas han ido en aumento, ejemplo de ello son los diversos estudios desarrollados con el objetivo de identificar alelos involucrados en caracteres de interés, como: volumen de expansión, forma de palomita, granos no reventados, peso de grano y rango de expansión, en los cuales se han reportado desde tres hasta 9 mQTL (Apéndice 1). Los estudios realizados para afirmar lo anterior se basan en poblaciones F₂, F₃, BC₁, BC₂, BC₂F₂, y RILs de cruza biparentales entre líneas de endospermo dentado y/o cristalino por una línea palomera, así como en poblaciones y líneas de maíz palomero y maíz dentado, utilizando marcadores tipo SSR y SNP (Babu *et al.*, 2006; Dhliwayo, 2008; Dong *et al.*, 2012, 2015; Li *et al.*, 2006, 2007, 2008, 2009; Liu *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2003; Paes *et al.*, 2016; Senhorinho *et al.*, 2019); sin embargo, son pocos los QTL consenso reportados, debido a factores como la interacción con el ambiente y a que los análisis estadísticos son sensibles al tipo de población de análisis utilizada (Coan *et al.*, 2019; Dhliwayo, 2008;

Senhorinho *et al.*, 2019). Algunos estudios han involucrado al maíz dentado como uno de los parentales en los análisis genéticos; sin embargo, los esfuerzos para desentrañar información sobre la contribución del maíz cristalino no palomero para un mayor volumen de expansión han sido limitados (Babu *et al.*, 2006; Coan *et al.*, 2019; Robbins and Ashman, 1984).

Una estrategia que proporciona una alternativa rentable al análisis de toda la población para el genotipo selectivo que haga posible el mapeo genético del fenómeno de reventado en maíz palomero es el análisis de segregantes en masa, conocido como análisis BSA (Bulk Segregant Analysis), en el cual se analizan genotípicamente individuos que presentan fenotipos extremos del carácter de interés (generalmente las dos colas de una población segregante), que se encuentren en desequilibrio de ligamiento, para identificar polimorfismos asociados al gen o genes de interés. Este método fue propuesto por Michelmore *et al.* (1991) utilizando marcadores moleculares RAPD. El método consiste en comparar dos grupos extremos de muestras de ADN (bulks), de individuos pertenecientes a una población segregante. Los grupos contrastantes se conforman mediante observaciones fenotípicas en la que los individuos son agrupados por similitud para un carácter o gen de interés, se analizan independientemente, utilizando técnicas como el GbS o DArTseq, pues es relativamente barato y rápido, además de que posibilita el uso de marcadores de alta densidad como los polimorfismos de nucleótido individual o SNP y por ello la precisión de la secuenciación aumenta.

Una herramienta biométrica para la selección confiable de los datos genotípicos es la identificación de los marcadores más informativos sobre el carácter de interés, utilizando la diversidad basada en el índice estándar de biodiversidad específica Shannon-Weaver (H), utilizado para las comunidades ecológicas. Los exponentes de Shannon y la información de la población, se destacan en su capacidad para expresar la diversidad de manera intuitiva y proporcionan un método generalizado de considerar el comportamiento a nivel de variantes alélicas para hacer predicciones, bajo condiciones específicas. La naturaleza jerárquica de la entropía y la información permite el modelado integrado de la diversidad a lo largo de una secuencia de ADN y entre diferentes secuencias dentro y entre poblaciones, especies, etc. Lo que se busca es identificar las conexiones formales entre la diversidad genética o variantes alélicas y el flujo de información fenotípica (Sherwin, 2010).

Con este fin, se pueden identificar los marcadores moleculares más informativos, utilizando la fórmula:

$$H = - \sum_{i=0}^2 p_i \log p_i$$

Donde i este caso $i = 0, 1, 2$ corresponde a la "proporción del alelo" ($0 = aa, 1 = Aa, 2 = AA$) y p_i se refiere a la frecuencia alélica correspondiente. Por lo tanto, este índice se puede calcular para cada marcador. Los valores altos de H están asociados con una mayor diversidad. El número efectivo de alelos basados en la entropía de Shannon, se puede obtener tomando el exponencial de H , es decir $n_e = \exp(H)$; sin embargo, dado que n_e aumenta a medida que H aumenta, basta con clasificar los marcadores de acuerdo con H , en el cual sus valores oscilan generalmente entre 2, 3 y 4. Se interpreta que valores menores a 2 son sistemas con una diversidad relativamente baja, mientras que los mayores a 3 son altos; es así que para identificar los marcadores más informativos, se puede calcular el índice de Shannon y seleccionar una fracción de los marcadores, por ejemplo, el 10% superior de esos marcadores.

Es evidente el rezago en la mejora genética de las razas de maíz palomero en México, ello coloca a estos maíces de usos especiales en una situación de vulnerabilidad; sin embargo, existen herramientas moleculares e informáticas, como las mencionadas, las cuales se podrían utilizar para realizar un acercamiento a las regiones genómicas asociadas al volumen de expansión (VE), carácter de mayor interés, a través de herramientas como el DArTseq con el uso de marcadores de alta densidad como los SNP empleando el análisis BSA y técnicas bioinformáticas como el uso de la entropía de Shannon-Weaver, para la identificación de los marcadores más informativos, lo cual hará posible identificar asociaciones causales. Por lo anterior el presente estudio tuvo como objetivos: 1) Detectar regiones genómicas asociadas al volumen de expansión a través de marcadores de alta densidad SNP, en una población segregante derivada de una cruce biparental entre una línea de maíz palomero \times una línea no palomera de endospermo cristalino, siguiendo la metodología de análisis de segregantes en masa y 2) Identificar los alelos con efectos causales sobre el VE, así como realizar una búsqueda de genes por homologación de secuencias, a través de la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST).

2.4. Materiales y métodos

2.4.1. Material genético

Se utilizaron ocho CMLs (CIMMYT Maize Lines) adaptadas a Valles Altos (Cuadro 2.1), facilitadas por el Banco de Germoplasma de Maíz del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (<http://hdl.handle.net/11529/10246>). La línea CML561 fue seleccionada, mediante pruebas de reventado, como la línea parental femenina, ya que mostró un VE superior al resto de las líneas evaluadas, posteriormente la población F₂ derivada de la cruce biparental de la línea palomera CML561 × CML558 con endospermo cristalino fue seleccionada con base en un análisis estadístico en el carácter VE, pues los resultados indicaron que resulto ser la población con la asimetría y el nivel de curtosis más cercanos a cero, así como la más divergente y por tanto más apropiada para estudios moleculares asociados a la capacidad de reventado en maíz palomero.

Cuadro 2.1. Descripción de las CMLs adaptadas a Valles Altos, utilizadas como parentales para formar siete cruces biparentales.

Línea	ID	DMF [†]	DFP ^{††}	TE	GH	VE (cm ³ 30g ⁻¹)
CML240	18199	80	86	Semidentado	A	65
CML246	18204	85	90	Semidentado	B, probador	95
CML457	25781	88	90	Dentado	A	118
CML459	25783	84	89	Semidentado	B	67
CML461	25785	84	85	Dentado	AB	96
CML527	27451	81	86	Semidentado	B	135
CML558	28117	90	94	Cristalino	AB	215
CML561	28120	89	91	Palomero	B	460

ID: Identificación de la línea en el Banco de Germoplasma; TE: Tipo de Endospermo; GH: Grupo Heterótico; VE: Volumen de Expansión. [†]DMF y ^{††}DFP: Los datos corresponden al promedio de los días a floración registrados en los ciclos: P-V, 2016 y P-V, 2017 en la localidad de COLPOS-Montecillo, así como los datos reportados en la base de datos del MGB del CIMMYT.

2.4.2. Obtención de la población de análisis F₂

Durante el ciclo Primavera-Verano (P-V) 2015, en la estación experimental del CIMMYT ubicada en Metepec, Estado de México, en el Valle de Toluca con una altitud de 2,670 metros, en el paralelo 19°15'00" latitud Norte y 99°36'10" longitud Oeste (EMM, 2018). En esta localidad se formaron las cruces biparentales de estas líneas, para lo cual se sembraron 110 semillas de cada

línea de maíz, repartidas en parcelas de siete surcos de 5.0 m de largo por 0.8 m de ancho, con una distancia de siembra de 0.50 m. Las cruza biparentales se realizaron mediante polinizaciones planta a planta.

Los ciclos P-V de 2016 y 2017 se llevaron a cabo en el campo experimental del Colegio de Postgraduados (COLPOS) ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México, con una altitud de 2,250 metros, en el paralelo 19°23'40" latitud Norte y 98°39'28" longitud Oeste (EMM, 2018). En el ciclo P-V de 2016 se sembraron 600 semillas de cada población F₁, repartidas en parcelas de 20 surcos de 9.0 m de largo por 0.8 m de ancho, con una distancia de siembra de 0.30 m, en las cuales se realizó una polinización manual mediante autofecundaciones para obtener la población F₂.

En el ciclo P-V de 2017, se sembraron, 600 semillas de cada población F₂, repartidas en parcelas de 20 surcos de 9.0 m de largo por 0.8 m de ancho, con una distancia de siembra de 0.30 m y se autofecundaron para incrementar las poblaciones segregantes, las cuales constituyeron las poblaciones de análisis, en este ciclo se sembraron los parentales con el fin de fenotiparlos. Las plantas se numeraron y etiquetaron, con el objetivo de mantener su identidad hasta la prueba de expansión. Cuando la planta se encontraba en etapa de pre-antesis se colectó tejido foliar, tomando parte de la segunda y/o tercer hoja más joven en dirección acropétala, colocándolas en bolsas de papel encerado debidamente etiquetadas y en su conjunto en bolsas con cierre hermético para mantenerlas aisladas de la humedad, las muestras se transportaron en hieleras con geles congelados y se almacenaron en un ultracongelador a - 80°C (Thermo Scientific™, modelo 88500V, Madrid España) para la posterior extracción del ADN de los individuos seleccionados por VE. Posteriormente se realizó la autopolinización de cada planta para obtener la población de análisis. Las mazorcas se cosecharon individualmente para realizar las pruebas de expansión, con el objetivo de obtener la matriz fenotípica e identificar a los individuos de interés. En cada ciclo agrícola se aplicaron las labores culturales propias del cultivo y de la zona.

2.4.3. Fenotipo de la población segregante

La población de análisis se cosechó una vez llegada su madurez fisiológica, con un contenido de humedad de 16 ± 2 % y las mazorcas se almacenaron a temperatura ambiente. Las muestras para la prueba de expansión se constituyeron tomando 30 g de cada mazorca, se etiquetaron y se colocaron en una bolsa de organza para colocarlas en una cámara de ambiente controlado (CONVIRON S10H, serie 970106, Winnipeg, Manitoba, Canadá) a una temperatura de 21 °C al

70 % de humedad relativa durante 30 días, tiempo en que alcanzaron una humedad de equilibrio de 13.5 ± 0.5 %.

La evaluación del VE se realizó con la metodología desarrollada por The Iowa State University Popcorn Program, la cual consiste en reventar la muestra en un horno de microondas convencional. Se colocó la muestra en una bolsa de papel de estraza de 250 cm^3 de capacidad, realizando dobleces para evitar la salida de los granos reventados. Se utilizó un horno de microondas convencional de 1000 W (DAEWOO KOR-164HL, México) con un tiempo de 2:45 min al 70 % de potencia. Se midió el VE de las palomitas en una probeta graduada de 2000 mL (Ziegler, 2001) y se realizó un ajuste del volumen final, restando el volumen de los granos antes de reventar.

2.4.4. Análisis BSA asistido con marcadores de alta densidad SNP

Los individuos contrastantes en VE se utilizaron para formar dos grupos siguiendo la metodología de análisis BSA. La subpoblación 1 se constituyó con los individuos con bajo o nulo VE y los individuos con un VE similar o superior al parental palomero constituyeron la subpoblación 2, para identificar los marcadores con el mayor aporte a la varianza fenotípica en cada subpoblación (Michelmore *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 2010, Zou *et al.*, 2016). Una vez identificados a los individuos de cada grupo, se acudió a la reserva del tejido foliar almacenado de los individuos seleccionados para continuar el proceso en laboratorio.

2.4.5. Extracción del ADN genómico y secuenciación

La extracción del ADN genómico y la secuenciación se llevaron a cabo en el laboratorio del Servicio de Análisis Genético para la Agricultura (SAGA) del CIMMYT. Para la extracción del ADN se liofilizó el tejido foliar y se identificó cada muestra generando una etiqueta única por individuo considerando su origen genético y localidad, denominada GID (Cuadro 2.2). El ADN se extrajo de un compuesto de tejido de igual área (28 mm^2) de las hojas liofilizadas de cada individuo seleccionado, así como el ADN de los parentales, utilizando el método CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio). La calidad y concentración del ADN se determinaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % con un estándar de λ DNA (CIMMYT, 2005). El ADN se cuantificó en $1 \mu\text{L}$ por muestra con un espectrofotómetro de ultra-bajo volumen NanoDrop-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE. UU.) a través de lecturas de absorbancia de 260/280 nm y se diluyó a una concentración de 30-50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$.

La secuenciación se realizó utilizando la tecnología DArTseq (www.diversityarrays.com/), generando una representación genómica del conjunto de muestras al digerir el ADN genómico con la combinación de dos enzimas de restricción: PstI (CTGCAG) y HpaII (CCGG) ligadas con adaptadores marcados con un código de barras para identificar cada muestra. En cada placa de 96 pozos se replicó el 16 % de las muestras para evaluar la reproducibilidad. Los productos de amplificación se agruparon por placa para clonarlos por medio de PCR de puente en un generador clonal automatizado cBot (SY-301-2002, Illumina, San Diego, CA, EE.UU.), seguido de la secuenciación de fragmentos por medio de la plataforma Hiseq 2500 (www.illumina.com). Los SNP se procesaron utilizando DArTsoft (<http://www.diversityarrays.com/software.html#dartsoft>), en el cual se realizó el alineamiento de las lecturas utilizando como referencia el genoma de la línea de maíz B73 RefGen_v4 (Jiao *et al.*, 2017).

2.4.6. Análisis estadístico

Los datos se recodificaron teniendo que: 0 = aa, 1 = Aa, 2 = AA; posteriormente, fueron seleccionados mediante QC; es decir, se eliminaron los marcadores monomórficos, conservando los que presentaron menos del 10 % de datos ausentes, a los cuales se les realizó una imputación utilizando las frecuencias alélicas observadas y se aplicó un filtro de los marcadores con una frecuencia del alelo menor del 5 % ($MAF \leq 0.05$) eliminándolos, para obtener la matriz genómica (G), derivada de los datos fenotípicos y genotípicos, la cual se obtiene al incluir la matriz de relaciones genómicas obtenida por el método de VanRaden (2007), es decir, aplicando la fórmula:

$$K = \frac{ZZ'}{2\sum p_i(1 - q_i)}$$

Donde, \mathbf{Z} = matriz de marcadores moleculares resultante al eliminar \mathbf{P} que representa a los marcadores no seleccionados por QC. La sustracción de \mathbf{P} en la matriz \mathbf{M} da como resultado la matriz \mathbf{Z} , que es necesaria para establecer el valor esperado de \mathbf{u} , la cual se refiere al vector que contiene los efectos genéticos aditivos para cada alelo o cada marcador. La sustracción de \mathbf{P} da más crédito a los alelos raros que a los alelos comunes al calcular las relaciones genómicas, p_i se refiere a la frecuencia del marcador $i = 1, \dots, m$. El resultado es la matriz de varianzas y covarianzas entre los individuos, denominada matriz \mathbf{K} . Una vez filtrados los marcadores, se aplicó la fórmula de entropía de Shannon-Weaver, con el objetivo de seleccionar el 10 % de los SNP más informativos ($H = 0.10$).

Cuadro 2.2. Individuos seleccionados de la población F₂ de la crucea biparental CML561 × CML558 para conformar los grupos contrastantes con base en el VE.

GID	Individuo	VE	GID	Individuo	VE	GID	Individuo	VE	GID	Individuo	VE
1013428	211	00	1013453	470	60	1013478	485	635	1013503	298	410
1013429	191	10	1013454	001	65	1013479	152	540	1013504	325	410
1013430	229	10	1013455	351	65	1013480	189	540	1013505	494	400
1013431	114	15	1013456	119	66	1013481	069	530	1013506	077	386
1013432	099	20	1013457	472	67	1013482	371	530	1013507	140	380
1013433	172	25	1013458	309	68	1013483	480	510	1013508	214	380
1013434	353	29	1013459	165	70	1013484	027	500	1013509	437	380
1013435	067	30	1013460	431	74	1013485	153	480	1013510	376	379
1013436	141	30	1013461	285	75	1013486	252	480	1013511	170	370
1013437	258	30	1013462	050	80	1013487	202	466	1013512	473	370
1013438	166	40	1013463	081	80	1013488	059	465	1013513	002	360
1013439	306	40	1013464	127	80	1013489	005	460	1013514	012	360
1013440	482	40	1013465	131	80	1013490	204	460	1013515	058	360
1013441	110	44	1013466	323	80	1013491	344	460	1013516	091	360
1013442	268	45	1013467	327	80	1013492	057	450	1013517	161	360
1013443	396	46	1013468	385	84	1013493	174	450	1013518	198	360
1013444	150	50	1013469	238	85	1013494	253	450	1013519	381	360
1013445	209	50	1013470	355	85	1013495	079	440	1013520	449	360
1013446	357	50	1013471	496	85	1013496	181	440	1013521	041	354
1013447	478	50	1013472	109	90	1013497	364	440	1013522	019	350
1013448	007	60	1013473	350	90	1013498	294	439	1013523	052	350
1013449	068	60	1013474	414	90	1013499	456	425	1013524	192	350
1013450	237	60	1013475	055	95	1013500	015	420	1013525	259	350
1013451	275	60	1013476	314	97	1013501	201	420	1013526	284	350
1013452	433	60	1013477	445	97	1013502	453	420	1013527	468	350

GID: Código generado para la identificación del individuo con base en su origen genético a y tipo de población. Los parentales se codificaron como: CML561 GID: 1013528 y CML558 GID: 1013529.

La heredabilidad en sentido estricto, se calculó asumiendo que los coeficientes de los marcadores provienen de una distribución $N \sim (0, \delta_{\beta}^2)$, utilizando la fórmula:

$$h_j^2 = \frac{\delta_{a_j}^2}{\delta_{a_j}^2 + \delta_{e_j}^2}$$

Donde, $\delta_{a_j}^2$ = varianza para el marcador $j = 1; \dots; p$ y $\delta_{e_j}^2$ = varianza del residual (Yi y Xu, 2008).

2.4.8. Análisis del genoma completo y alineación de secuencias por BLAST

El estudio de asociación a través del genoma (GWAS), se realizó utilizando las subpoblaciones, para evaluar el poder estadístico del modelo y la sensibilidad del mismo a la estructura de la población, las poblaciones fueron descritas como: Subpoblación 1 (VE bajo) y Subpoblación 2 (VE alto). En los análisis se incluyeron los componentes principales CP1 a CP3, derivados del análisis de los marcadores seleccionados (**G + K**), como covariables para corrección por estructura de población y reducción de falsos positivos. El análisis GWAS se realizó mediante la herramienta integrada para la asociación genómica y predicción (GAPIT) en R (<http://zzlab.net/GAPIT>).

En este estudio, los SNP que presentaron una asociación significativa con el VE, pero no se ubicaron en ninguno de los 10 cromosomas de acuerdo con el mapa de ligamiento, se colocaron en un cromosomas extra, denominado Cromosoma 11 en una numeración consecutiva, para no eliminar un posible gen candidato. Una vez filtrados los marcadores por subpoblación, se seleccionaron los diez marcadores más informativos con base en la información arrojada por la formula $-\log_{10}(P \text{ valor})$. Finalmente se realizó una búsqueda en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de EE.UU. a través de la herramienta básica de búsqueda de alineación local o BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y en la base de datos de genes ortólogos OrthoDB (Kriventseva *et al.*, 2018) y se identificaron aquellos reportados en la especie *Zea mays* L. (<https://www.orthodb.org/?ncbi=1&query=100383867>).

2.5. Resultados y discusión

2.5.1. Selección de los datos genéticos por análisis QC

Un total de 9,906 SNP no imputados fueron llamados exitosamente dentro del conjunto de datos. Los marcadores fueron filtrados y seleccionados con la metodología descrita, obteniendo un total de 5,526 SNP (Figura 2.1).

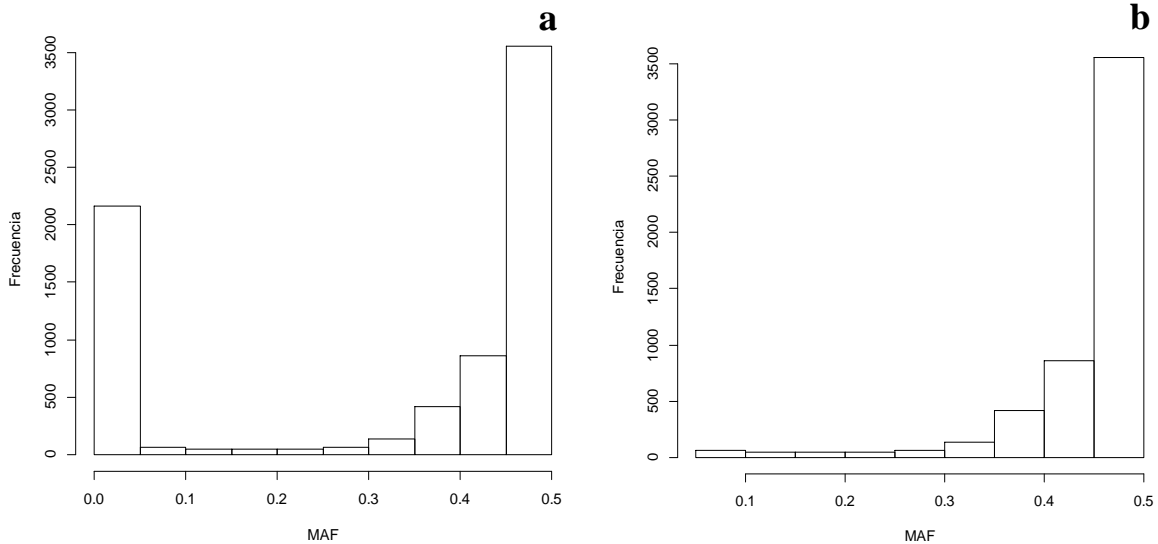


Figura 2.1. Frecuencia de distribución del alelo menor (MAF). a) Proporción de MAF basada en la matriz genómica con 9,906 SNP; b) Matriz filtrada por $MAF \leq 0.05$ con 5,526 SNP.

2.5.2. Selección de marcadores por exponenciales de Shannon-Weaver

Los exponenciales de Shannon-Weaver (H) calculados con la matriz de datos filtrados por QC con 5,526 SNP, se pueden apreciar en la Figura 2.2. Los valores más altos de H están asociados con una mayor diversidad a nivel de variantes alélicas para hacer predicciones, bajo las condiciones específicas de este estudio. Se observa que buena parte de los marcadores seleccionados, presentaron un índice de variantes alélicas aceptable, considerando que se trata de una F_2 derivada de una cruce biparental, asumiendo una segregación 1:2:1 para los alelos heredados de los padres (Sherwin, 2010).

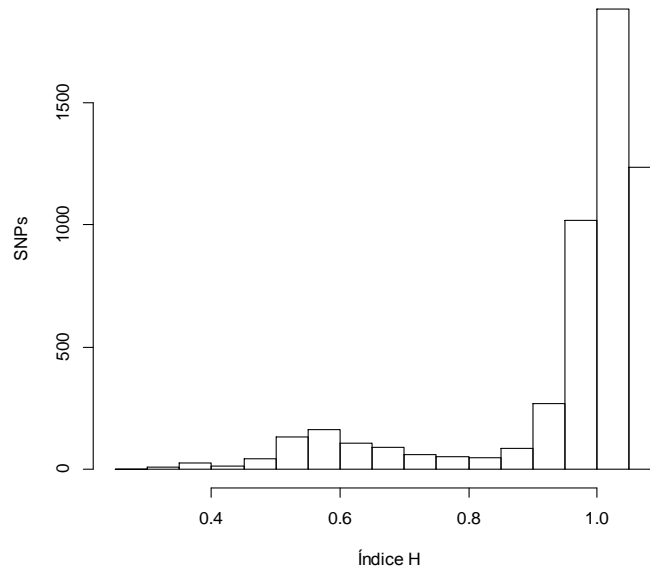


Figura 2.2. Exponenciales de Shannon-Weaver (H) de acuerdo con la información de la población, considerando el comportamiento a nivel de variantes alélicas, bajo las condiciones específicas descritas en el ensayo. En el eje Y se muestra el número de marcadores SNP.

2.5.3. Matriz de relaciones genómicas de VanRaden

La matriz de relaciones genómicas de VanRaden (\mathbf{K}) se representaron a través de un mapa de calor para observar las relaciones genómicas de la población, el cual se presenta en la Figura 2.3. En el mapa de calor se observan agrupaciones entre los individuos con base en los alelos heredados; sin embargo, estas agrupaciones no son discriminantes, pues se aprecia que algunos loci son compartidos entre ambos grupos fenotípicos, en frecuencias diferentes y por ello algunos individuos con VE alto también se encuentran agrupados con individuos con VE bajo, ello indica que el carácter está definido por varios genes de acción aditiva con diferentes efectos (Ashman, 1983; Ziegler, 2001; Lu *et al.*, 2003). Se observa una diferenciación clara entre la línea de maíz palomero y la línea de endospermo cristalino. Asumiendo la teoría sobre genes complementarios en la expresión del carácter, una de las predicciones es que la complementariedad se construye más fácilmente en poblaciones autóгамas o líneas, que en poblaciones alógamas, es por ello que cuando se realiza una cruce biparental se observan individuos transgresivos en la F_2 , como se presentó en la población evaluada en este estudio.

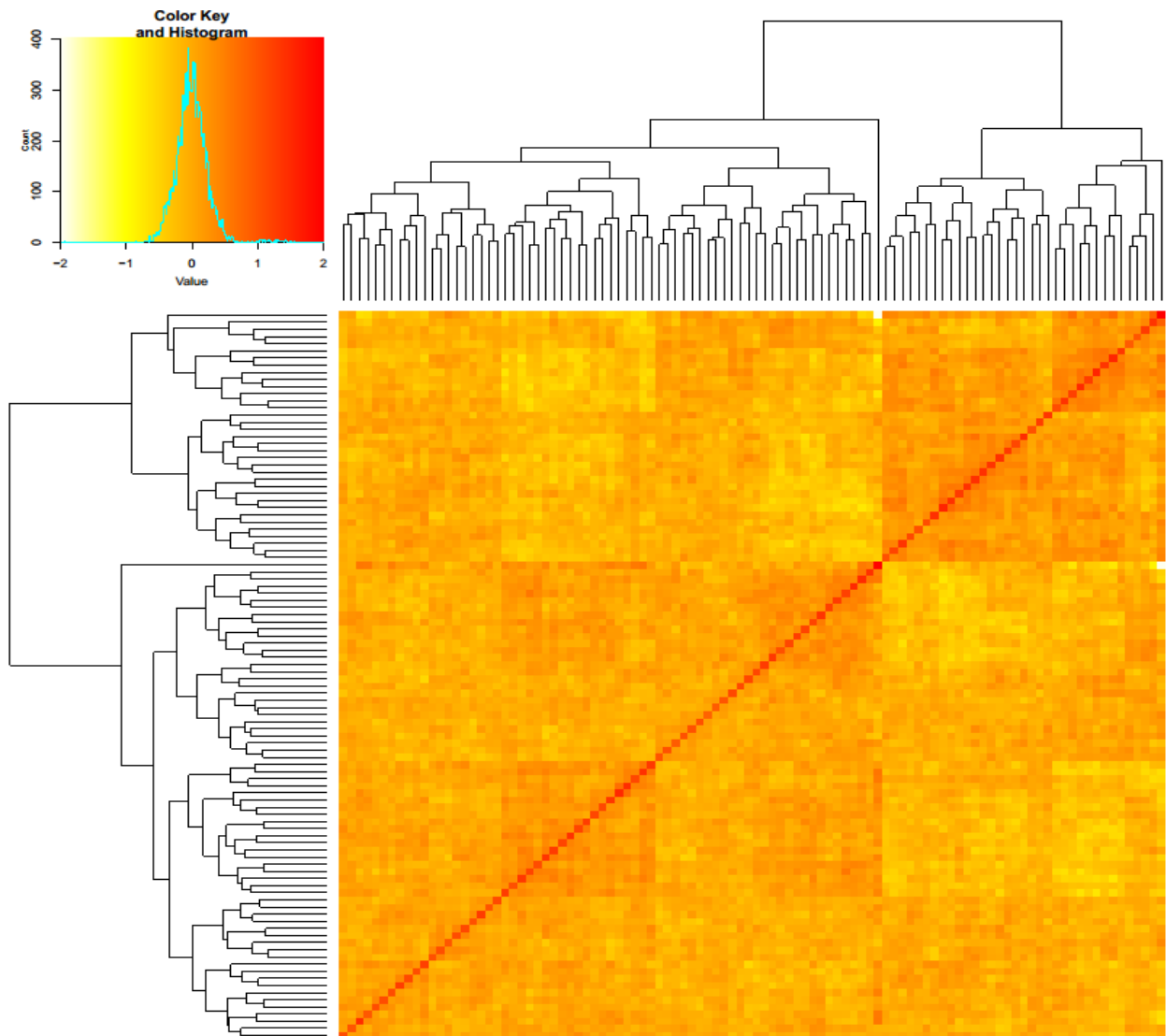


Figura 2.3. Matriz de relaciones genómicas de 100 individuos F2 y ambos parentales, basada en 553 SNP para el carácter VE de la crucea CML561 × CML558. Los dendogramas de los extremos representan las distancias entre grupos usando el método de agrupamiento por promedio aritmético de grupos de pares no ponderados (UPGMA).

Una explicación alternativa a la segregación transgresiva observada, es que la heterosis juega un papel importante en este efecto e implica la sobredominancia o la dominancia parcial de un locus en individuos heterocigotos (Rieseberg *et al.*, 1999), principalmente por la estructura genética de las líneas divergentes evaluadas en este estudio y por los grupos heteróticos a los que pertenecen (Cuadro 2.1). Otra explicación, es que posiblemente ambas poblaciones poseen alelos favorables para reventado y la diferencia en el VE radica en la frecuencia de éstos, siendo mayor en los maíces palomeros que en aquellos con diferente tipo de endospermo, los cuales para exhibir capacidad de reventado requieren de un umbral mínimo en la frecuencia de alelos favorables, es por ello que los segregantes comienzan a mostrar capacidad de reventado con magnitudes relativamente altas.

La teoría más aceptada es que existen alelos complementarios de efectos aditivos en ambos parentales con efectos opuestos dentro de la línea cristalina no palomera o con baja frecuencia de alelos favorables, lo cual no permite alcanzar el umbral de reventado a las línea *per se*; sin embargo, el fenómeno de recombinación meiótica posibilita la conjunción de alelos favorables en los individuos segregantes F₂, con frecuencias arriba de las del parental palomero, lo cual concuerda con la presencia de segregación transgresiva de los individuos genotipados (Rieseberg *et al.*, 1999).

2.5.4. Estudio de Asociación del Genoma Completo (GWAS)

El análisis de ligamiento se realizó para identificar SNP con una posible asociación causal con el fenotipo de interés. Para ello se identificaron regiones del genoma asociadas al VE a través de modelos lineales mixtos (MLM) mediante el software GAPIT. Este proceso se replicó en los grupos de análisis. La prueba de hipótesis del modelo para cada población se muestra en la Figura 2.4, en la cual se declara como H₀ = los SNP no tienen efecto sobre el VE vs H_a = los SNP tienen efecto sobre el VE. El análisis de los datos mostró que existen marcadores con efectos positivos y negativos sobre el VE; sin embargo, se observan valores debajo de la línea de valores esperados de acuerdo con la H₀, lo que podría significar la presencia de asociaciones espurias. Por ello se debe considerar la estructura de la población al evaluar el poder del modelo, ya que podría haber un proporción de falsos negativos, especialmente cuando un número pequeño de genotipos están involucrados y los efectos de la estructura de la población para reducir el número de falsos positivos, una estrategia para aminorar estos efectos es el uso de los componentes principales derivados del análisis de asociación (Yu y Buckler, 2006).

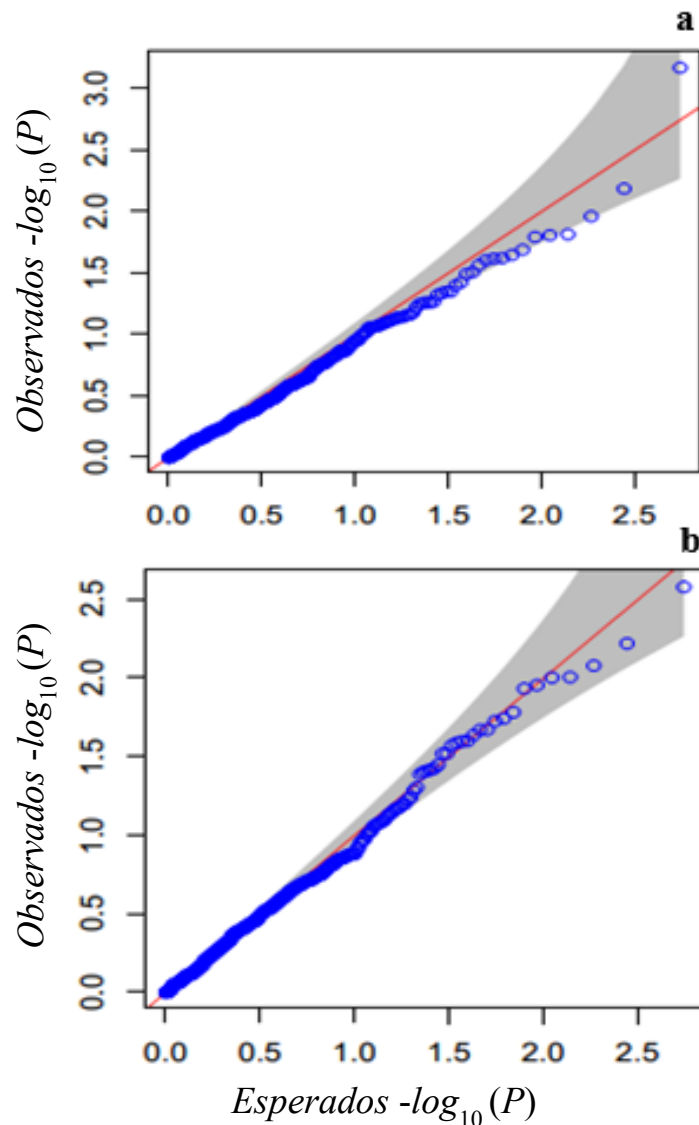


Figura 2.4. Grafica Cuántil-Cuántil de valores predichos vs observados del análisis GWAS, utilizando MLM considerando la matrices G +K y tres componentes principales para control de la estructura de la población. a) Subpoblación 1; b) Subpoblación 2.

El análisis de asociación (GWAS) por población, se muestra en el grafico Manhattan de la Figura 2.6 y los datos en el Apéndice 2. Los SNP del cromosoma 11, no se ubicaron en alguno de los 10 cromosomas, debido a que el genoma de referencia utilizado para la alineación de las secuencias fue B73 RefGen_v4 (Jiao *et al.*, 2017), el cual es un maíz dentado de clima templado y la población de análisis deriva de líneas de origen tropical, adaptadas a Valles Altos; por ello, existen alelos no alineados en el genoma de referencia con efectos sobre el carácter VE.

Al analizar las subpoblaciones se obtuvo lo siguiente:

- a) Subpoblación 1. Los SNP con el mayor efecto en el VE de los individuos no reventadores, se encuentran ubicados en los cromosomas: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 y 11, que en conjunto explican el 4.4 % de la varianza fenotípica.
- b) Subpoblación 2. Los SNP con el mayor efecto en el VE de los individuos reventadores, se encuentran ubicados en los cromosomas: 1, 3, 5, 7, 8, 10 y 11, que en conjunto explican el 4.9 % de la varianza fenotípica.

Los resultados obtenidos al analizar las subpoblaciones coinciden con lo reportado por Babu *et al.*, (2006), quienes identificaron 4 QTLs ubicados en los cromosomas 1, 3, 4, 5, 9 y 10 para los caracteres VE, tamaño de palomita y porcentaje de granos no reventados en una población F₂ derivada de una cruce biparental entre línea palomera × línea cristalina, utilizando microsatélites (SSR), excepto para el cromosoma (Cr) 9, pues en este estudio no se encontraron marcadores con asociación al VE. En otro estudio realizado por Lu *et al.* (2003) sobre una población BC₁S₁ derivada de una cruce trilineal de maíz palomero × híbrido dentado, utilizando SSR, reportaron 4 QTLs ubicados en los cromosomas 1, 3 y 5 para el carácter VE.

Los estudios realizados por Li *et al.* (2006, 2007, 2008, 2009); Dhliwayo (2008); Yongbin *et al.* (2012); Dong *et al.* (2015); Paes *et al.* (2016) y Senhorinho *et al.* (2019), se reportan otras regiones importantes ubicadas en los cromosomas: 2 y 6, en poblaciones F_{2:3}, BC₂F₂, y RILs derivadas de cruces entre maíz palomero × dentado, utilizando SSR y SNP, lo cual coincide con este estudio en el Cr 2 al analizar la población de los individuos no reventadores y difiere en el Cr 6 pues en no se encontraron marcadores asociados al carácter en ninguna de las subpoblaciones, ello obedece al tipo de población de análisis utilizada y al tipo de endospermo de cada línea parental (Apéndice 1).

Destaca el hecho de que en los análisis realizados por otros investigadores, utilizando cruces que involucran una línea palomera × líneas cristalinas no palomeras, se reportan regiones en los cromosomas: 1, 3, 4, 5, 9 y 10, lo cual concuerda con lo encontrado en este estudio, exceptuado el hecho de que en estos estudio no se reportan regiones en el Cr 7 las cuales fueron consistentes al analizar las dos subpoblaciones, lo cual se trata de una aproximación a las regiones del genoma involucradas en el carácter VE. Así mismo, revela que existen regiones específicas para el endospermo cristalino, aunado a ello las relaciones encontradas entre los marcadores

involucrados en la determinación fenotípica mostraron una alta correlación con la estructura y el tamaño de la población de estudio y dada esa relación pueden existir más alelos involucrados en el carácter; sin embargo, las aproximaciones estadísticas podrían no distinguir los efectos de otros alelos con frecuencias que varían a través de las poblaciones, pudiendo resultar en una proporción alta de falsos negativos (Dhliwayo, 2008; Senhorinho *et al.*, 2019; Coan *et al.*, 2019).

Los resultados obtenidos muestran ligamiento entre diversos loci y el fenotipo; por ello, se realizó la búsqueda de genes candidatos para identificar si el alelo es la causa del fenotipo o si el alelo no causa el fenotipo pero se encuentra en desequilibrio de ligamiento con otro alelo que sí lo causa, por encontrarse el alelo causante del fenotipo cercano físicamente al alelo en estudio.

2.4.6. Búsqueda de regiones codificantes por el método BLAST

Las secuencias de los diez SNP obtenidos en el análisis de las subpoblaciones (Apéndice 2), fueron utilizados para realizar una búsqueda en el GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) a través de la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Es de importancia mencionar que en todas las poblaciones de análisis, los locus presentaron rangos elevados de estimación de falsos positivos (FDR > 10), por lo que se debe considerar el umbral de confianza pues con este criterio no presentan significancia (Benjamini and Hochberg, 1995); sin embargo, en otro escenario estadístico válido, los otros indicadores [$-\log_{10}$ (P valor); MAF y h^2] presentaron niveles altos de control de calidad y significancia, al seleccionar los SNP, debido principalmente a que la población de análisis es homogénea y al modelo estadístico seleccionado.

a) Análisis de la Subpoblación 1

Los alelos de efectos significativos encontrados al analizar la población, que validaron para genes candidatos, se presentan en el Cuadro 2.3 y en el Apéndice 2. Los diez marcadores más informativos se ubicaron en los cromosomas: 1 (2), 2, 3, 4 (2), 5, 7, 8 y 11. En todos los casos el $MAF \geq 0.40$. Los loci con efectos negativos sobre el VE se ubicaron en los cromosomas 2, 3, 4 (2), 5 y 8 (-15.2, -16.8, -13.3, -14.7, -21.3 y -18.8 $\text{cm}^3 \text{30 g}^{-1}$, respectivamente), los cuales se alinearon a genes candidatos involucrados directamente en las funciones y estructuras de la pared celular.

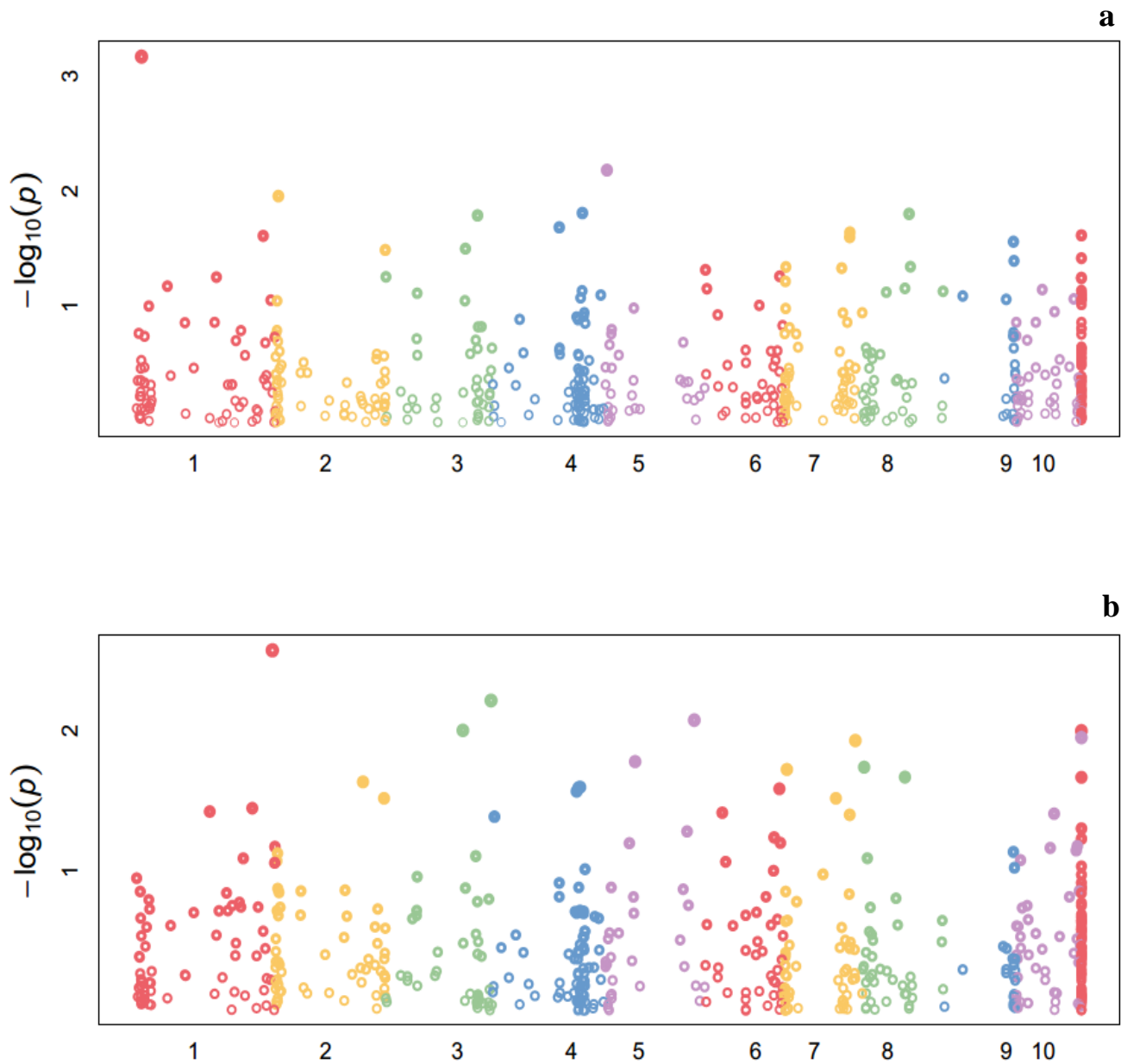


Figura 2.5. Gráfica Manhattan del modelo MLM. En el eje X se presenta la posición de los SNP en el genoma y en el eje Y el $-\log_{10}$ (Valor P). Cada cromosoma está representado con un color diferente. Los SNP con asociaciones fuertes con el VE presentan un valor alto en la coordenada del eje Y. a) Subpoblación 1; b) Subpoblación 2.

El alelo 4589591|F|0-63:C>G, ubicado en el Cr 2 codificó para una proteína homóloga a SDA1, cuya función biológica en maíz es la organización de actina en el citoesqueleto; por otra parte el alelo 4774118|F|0-24:T>G ubicado en el Cr 3, codificó para la enzima glutamato carboxipeptidasa 2 (GCPII), cuya función biológica está involucrada en la proteólisis, en el desarrollo de organismos multicelulares y en la regulación del crecimiento y maduración de las semillas. El alelo 29627876|F|0-65:G>A, ubicado en el Cr 5 se reporta como un gen candidato de la pared celular. Finalmente el alelo 2410910|F|0-20:A>G en el Cr 8 codifica para un gen tipo receptor de proteína kinasa de efecto pleiotropico involucrado en la estructura de la membrana plasmática y de la membrana de orgánulos; complejo receptor de lipopolisacáridos; componente integral de la membrana del tilacoide; parte del complejo de los poros celulares y en el complejo transportador transmembranal.

Por otro lado, se aprecian loci en el Cr 1 en regiones cercanas, con efecto positivo sobre el VE (26 y 11.7 cm³ 30 g⁻¹); en este cromosoma ambos alelos codificaron para genes candidatos; el alelo 100012213|F|0-17:G>A fue validado para una proteína similar a la kinesina KIN-UA cuya función es un motor molecular con movimiento basado en microtúbulos; la regulación del proceso basado en microtúbulos y el desarrollo radicular; así mismo, el alelo 9667547|F|0-28:C>A fue validado para la transcripción de serina/treonina-kinasa SMG1 y TOR. Finalmente, los marcadores ubicados en los cromosomas 7 y 11 presentaron efectos a favor del VE (10 y 14 cm³ 30 g⁻¹, respectivamente), de los cuales no se reportan genes candidatos.

La función de la kinasa asociada a los genes candidatos en los cromosomas 1 y 8 es catalizadora en el intercambio de grupos fosfato entre compuestos ricos en ATP y otros sustratos; participan en procesos como el aumento de nivel energético de diferentes compuestos, para convertirlas en moléculas metabólicamente activas, la generación de ATP y GTP en diferentes vías metabólicas y la modificación covalente de la actividad enzimática.

Las proteínas asociadas a la membrana intervienen en la función de esta estructura, la densidad y cantidad de estas proteínas varía según el tipo de célula y la ubicación dentro de la misma, encontrando que la membrana de la mitocondria interna tiene un 76 % de proteína. Estas proteínas adquieren importancia debido a que existe una gran cantidad de genes que codifican para estas membranas con funciones adicionales en la adhesión celular, como lo reportado en esta investigación con el gen candidato GRMZM2G355098 ubicado en el Cr 8 que codifica a un gen de tipo receptor de proteína quinasa de efectos pleiotropicos involucrado en: la estructura

de la membrana externa de la célula, la membrana plasmática y de la membrana de orgánulos; actúa como complejo receptor de lipopolisacáridos; componente integral de la membrana del tilacoide; en el complejo de los poros celulares y en el complejo transportador transmembranal. Este gen se ha reportado como codificante en 12,214 genes de la membrana celular y 12,186 genes en componentes integrales de la membrana, reportados en la plataforma OrthoDB, los cual hace inferencia de la importancia de este gen en los componentes de la pared celular (Kriventseva *et al.*, 2018).

Cuadro 2.3. Localización de SNP y genes candidatos con asociación significativa para el carácter VE con base en el $-\log_{10}$ (P valor) y MAF, del análisis de la Subpoblación 1.

SNP	Cr	Posición	Gen candidato / Sinónimos
100012213 F 0-17:G>A	1	11953311	LOC103631734, GRMZM2G445783
9667547 F 0-28:C>A	1	279082269	LOC103643975; GRMZM2G033135; GRMZM2G418263
4589591 F 0-63:C>G	2	7652852	LOC103645893, GRMZM2G121074
4774118 F 0-24:T>G	3	202508053	LOC100280900; GRMZM2G159171
4770238 F 0-14:G>A	4	198622843	LOC100285130, cl45039_-2a
4583309 F 0-12:A>C	4	147827468	LOC100383867, GRMZM2G038820
29627876 F 0-65:G>A	5	7700163	LOC103625887, GRMZM2G087482
2395757 F 0-5:T>C-5	7	146875774	LOC100216583, GRMZM2G052233
2410910 F 0-20:A>G	8	102775798	LOC103635614, GRMZM2G355098

Cr: Cromosoma.

b) Análisis de la subpoblación 2

Los alelos de efectos significativos encontrados al analizar la población, que validaron para genes candidatos, se presentan en el Cuadro 2.4 y en el Apéndice 2. Los diez marcadores más informativos se ubicaron en los cromosomas: 1, 3 (2), 5 (2), 7 (2), 8, 10 y 11. En todos los casos el $MAF \geq 0.40$. Los loci con efecto positivo sobre el VE se ubicaron en los cromosomas: 3, 7 (2), 10 y 11 (36, 30, 35, 48 y $51 \text{ cm}^3 \text{ 30 g}^{-1}$, respectivamente), de los cuales el alelo 2382814|F|0-20:G>A en el Cr 7 se validó como un gen candidato componente de microtúbulos; también está involucrado al desarrollo de organismos multicelulares, al crecimiento celular unidimensional y como factor responsable de la unión de microtúbulos. El alelo 2505100|F|0-14:G>C, ubicado en el Cr 10 codificó para la enzima glutamil-ARNt reductasa con actividad oxidoreductasa. Los loci con efecto negativo sobre el VE se ubicaron en los cromosomas 1, 3, 5 (2) y 8 (-38, -38, -

35, -38 y -34 cm³ 30 g⁻¹, respectivamente). El alelo 4582594|F|0-34:T>A en el Cr 5 fue validado como un componente integral de la membrana celular.

Cuadro 2.4. Localización de SNP y genes candidatos con asociación significativa para el carácter VE con base en el $-\log_{10}$ (P valor) y MAF, del análisis de la Subpoblación 2.

SNP	Cr	Posición	Gen candidato / Sinónimos
2497939 F 0-20:C>T	1	299310403	NC
2382471 F 0-57:C>T	3	232180365	LOC100282241, pco117250; GRMZM2G035620
100012313 F 0-33:C>T	3	170269576	LOC100284088; pco134887; GRMZM2G064936
2442460 F 0-41:G>A	5	199620612	LOC542197; GRMZM2G090595
4582594 F 0-34:T>A	5	69613751	LOC100277615, cl4689_1; GRMZM2G159142
2382814 F 0-20:G>A	7	158892468	LOC103633238, GRMZM2G177300, GRMZM2G360949
4772961 F 0-38:T>C	7	8491422	LOC103631988, GRMZM2G377761
7049836 F 0-64:G>A	8	4175603	LOC100193028, pco081025; GRMZM2G139952
2505100 F 0-14:G>C	10	145316326	LOC100191548; gtr1; GRMZM2G177412

NC. No codificante para la especie *Zea mays* L.

Los alelos validados como genes candidatos causales del fenotipo reportados en este estudio están involucrados en su mayoría a la estructura de la pared celular, poros nucleares y microtúbulos, que aportan rigidez al pericarpio, lo cual concuerda con lo reportado por Paes *et al.* (2016), quienes validaron genes asociados a la capacidad de expansión involucrados en la biosíntesis del almidón, el metabolismo de lípidos, polisacáridos de la pared celular (hemicelulosa, celulosa y pectina) y en los procesos metabólicos/catabólicos de proteínas de almacenamiento, como la síntesis de α -zeínas.

Los alelos reportados en los cromosomas 1, 3 y 8 que codifican como genes candidatos para proteínas de la membrana o que están relacionadas a ellas (MAP), intervienen en la función de la membrana, la densidad y cantidad de estas proteínas varía según el tipo de célula y la ubicación dentro de la misma, por ejemplo la membrana interna de la mitocondria tiene un 76 % de proteína, involucradas en la adhesión celular (Lodish *et al.*, 2008), en esta investigación se reporta el gen candidato GRMZM2G355098 ubicado en el Cr 8 (2410910|F|0-20:A>G) el cual codifica a un gen tipo receptor de proteína quinasa de efecto pleiotropico involucrado en: la estructura de las membranas celulares; actúa como complejo receptor de lipopolisacáridos; en el complejo de los poros celulares y en el complejo transportador transmembranal, estas proteínas de la membrana adquieren importancia, pues se ha reportado como codificante en

12,214 genes de la membrana celular y 12,186 genes en componentes integrales de la membrana, reportados en la plataforma OrthoDB, los cual hace inferencia de la importancia de este gen involucrado en los componentes de la pared celular (Kriventseva *et al.*, 2018).

En esta investigación también se reportan proteínas de membrana que actúan como anclaje para las fibras del citoesqueleto que se encuentran en el citosol, lo que confiere forma, fuerza y estabilidad a las células y membranas, características necesarias para que se lleve a cabo el proceso de expansión de los gránulos de almidón que al entrar a una fase de equilibrio dinámico del agua al ganar temperatura y la posterior ruptura de las membranas celulares al romperse ese equilibrio, formaran la palomita. Algunas proteínas periféricas que se asocian con la membrana, como las quinasas son solubles en agua y se unen a la membrana acercando a la enzima a su sustratos para activarla (Lodish *et al.*, 2008).

La membrana (retículo endoplasmático liso y rugoso), en la cual se lleva a cabo la síntesis de lípidos, proteínas de membrana y proteínas de secreción que luego son movidas al complejo de Golgi a través de los microtúbulos en motores moleculares como el gen candidato GRMZM2G445783 que codifica a kinesina KIN-UA ubicado en el Cr 1, reportado en esta investigación (SNP 100012213|F|0-17:G>A). Diversas proteínas de transporte en la membrana de la vacuola permiten que las células almacenen agua, iones y nutrientes, así mismo cuando la presión aumenta generada por el agua captada dentro de la vacuola la pared celular se estira, lo que hace que la célula crezca, en este proceso la membrana celular ofrece resistencia al rompimiento, pero en el proceso de nucleación con el aumento de temperatura el agua contenida entra a una fase de equilibrio dinámico que se conserva hasta que el contenida en la vacuola y los solutos contenidos en el citosol seden y comienza el proceso de ruptura de las estructuras internas (Mishra *et al.*, 2014; Sweley *et al.*, 2013; van der Sman y Bows, 2017).

Otros componentes importantes para que se lleve a cabo el proceso de expansión son las proteínas del citoesqueleto como los filamentos de actina o microfilamentos, los cuales se reportan en esta investigación, como el gen candidato SDA1 ubicado en el Cr 2 (4589591|F|0-63:C>G), cuya función biológica es la organización de actina en el citoesqueleto, además de los microtúbulos (α y β tubulina), de los cuales se reportan genes candidatos en los cromosomas: 1, 8 y 7 (GRMZM2G445783; GRMZM2G355098 y GRMZM2G177300, respectivamente) y los filamentos intermedios, los cuales están unidos por proteínas y organizados en retículos dentro de la célula le confieren estabilidad e incluso la consistencia de un gel al citosol, característica

necesaria para que comience el proceso de nucleación y el inicio de la ruptura de las membranas internas hasta el pericarpio. Los filamentos intermedios atraviesan el citosol y forman un entramado que sostienen a la membrana nuclear y ayudan a conectar las células para formar tejidos, además de que contribuye al movimiento celular, estas redes ofrecen la estructura final a la palomita al entrar a un proceso de enfriamiento y cristalización del endospermo (Mishra *et al.*, 2014).

En otros estudios se ha demostrado que el pericarpio y el almidón son factores importantes para el proceso de reventado, debido a las propiedades físicas de cada uno en cuanto a la capacidad de transferir calor, siendo el pericarpio en maíces palomeros 2.9 veces más eficiente en la difusión de calor dentro del grano y por la estructura del almidón cristalino, presenta dos veces mayor conductividad que en maíces no palomeros (daSilva *et al.*, 1993; Hoseney *et al.*, 1983). En cuanto al pericarpio, experimentará la transición de cristales en la gelatinización antes de la expansión del almidón (Gökmen, 2004), por ello se debe considerar la resistencia mecánica; que en maíces palomeros es aproximadamente cuatro veces mayor que en maíces no palomeros, lo que significa que estos granos pueden soportar la presión requerida (9.2 atmósferas) para favorecer los procesos de nucleación, apertura celular, ruptura y contracción que se presenta al aumentar la temperatura (180°C) lo cual provoca la formación de la palomita (Mishra *et al.*, 2014; Sweley *et al.*, 2013; van der Sman y Bows, 2017).

2.5. Conclusiones

Se detectaron regiones genómicas y variantes alélicas asociadas al volumen de expansión en una población segregante derivada de una crucea biparental entre una línea de maíz palomero × una línea no palomera de endospermo cristalino, en loci ubicados en los cromosomas: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 y 10 en algunos casos con más de dos loci.

Se identificaron genes candidatos por homologación de secuencias para genes involucrados con la estructura de la pared celular, factores de transcripción, proteínas asociadas a la membrana y el complejo transportador transmembranal, lo que infiere que la pared celular y el pericarpio como parte estructural externa del grano, son las estructuras físicas más importantes para determinar el VE en el maíz palomero.

Las regiones del genoma identificadas en este estudio no se habían reportado con anterioridad, lo que representan un aporte a la ciencia básica para el estudio del carácter; sin embargo, para que estos marcadores puedan ser utilizados en selección asistida por los fitomejoradores, se debe validar cada SNP individualmente.

2.6. Bibliografía

- Ashman R. B. (1983)** Popcorn. Plant disease control. Bulletin BP-4. *Historical Documents of the Purdue Cooperative Extension Service*. Purdue University, West Lafayette, Indiana EE.UU., <https://docs.lib.purdue.edu/agext/439>
- Babu R., S.K. Nair, A. Kumar, H.S. Rao, P. Verma, A. Gahalain, I.S. Singh, and H.S. Gupta (2006)** Mapping QTL for popping ability in a popcorn × flint corn cross. *Theoretical and Applied Genetics* 112:1392-1399, <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0242-1>
- Benjamini, Y. and Y. Hochberg (2015)** Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of Royal Statistic Society* 57:289-300.
- CIMMYT (2005)** Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Third edition. CIMMYT. 2006. Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. Tercera edición. México, D.F.: CIMMYT. ISBN: 968-6923-43-8.
- Chen, J., C. Zavala, N. Ortega, C. Petrolí, J. Franco, J. Burgueño, D. Costich and S. Hearne (2016)** The development of quality control genotyping approaches: a case study using elite maize lines. *PLoS ONE* 11:e0157236, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157236>
- Coan M. M. D., R. J. B. Pinto, M. C. Kuki, A.T. do Amaral Júnior, A. S. T. Figueiredo, C. A. Scapim and M. Warburton (2019)** Inheritance Study for Popping Expansion in Popcorn vs. Flint Corn Genotypes. *Agronomy Journal* 111:2174-2183, <https://doi.org/10.2134/agronj2019.04.0295>
- Collard B. C. and D. J. Mackill (2008)** Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 363:557-572, <http://doi.org/10.1098/rstb.2007.2170>
- da Silva W. J., B. C. Vidal, M. E.Q . Martins, H. C. vargas, C. Pereira M. zerbetto and L. C. M. Miranda (1993)** What makes popcorn pop. *Nature* 362:417, <https://doi.org/doi:10.1038/362417a0>
- Dhliwayo T. (2008)** Genetic mapping and analysis of traits related to improvement of popcorn. Retrospective Theses and Dissertations. 15863. UMI Number:3296798, <http://lib.dr.iastate.edu/rtd/15863>

- Dong Y., Z. Zhang, Q. Shi, Q. Wang, Q. Zhou and Y. Li (2015)** QTL identification and meta-analysis for kernel composition traits across three generations in popcorn. *Euphytica* 204:649-660, <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1360-0>
- Dong Y., Z. Zhang, Q. Shi, Q. Wang, Q. Zhou and Y. Li (2012)** Quantitative trait loci mapping and meta-analysis across three generations for popping characteristics in popcorn. *Journal of Cereal Science* 56:581-586. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.08.006>
- Elshire R. J., J. C. Glaubitz, Q. Sun, J. A. Poland, K. Kawamoto, E. S. Buckler, S. E. Mitchell (2011)** A robust, simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* 6:e19379, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>
- Gökmen S. (2004)** Effects of moisture content and popping method on popping characteristics of popcorn. *Journal of Food Engineering* 65:357-362, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.01.034>
- Hoseney R.C., K. Zeleznak and A. Abdelrahman (1983)** Mechanism of popcorn popping. *Journal of Cereal Science* 1:43-52, [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(83\)80007-1](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(83)80007-1)
- Jiao Y., P. Peluso, J. Shi, T. Liang, Michelle C. Stitzer, B. Wang et al. (2017)** Improved maize reference genome with single-molecule technologies. *Nature* 546:524-539, <http://doi.org/10.1038/nature22971>
- Karababa, E. (2006)** Physical properties of popcorn kernels. *Journal of Food Engineering* 72:100-107, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.11.028>
- Kriventseva E. V., D. Kuznetsov, F. Tegenfeldt, M. Manni, R. Dias, F. A. Simão and E. M. Zdobnov (2018)** OrthoDB v10: sampling the diversity of animal, plant, fungal, protist, bacterial and viral genomes for evolutionary and functional annotations of orthologs. *Nucleic Acids Research* 47:D807-D811. <http://doi.org/10.1093/nar/gky1053>
- Li, Y. L., Y. B. Dong and S. Z. Niu (2006)** QTL analysis of popping fold and the consistency of QTLs under two environments in popcorn. *Acta Genetica Sinica* 33:724-732, [https://doi.org/10.1016/S0379-4172\(06\)60105-4](https://doi.org/10.1016/S0379-4172(06)60105-4)
- Li, Y. L., Y. B. Dong, S. Z. Niu, D. Q. Cui (2007)** QTL for popping characteristics in popcorn. *Plant Breeding* 126:509-514, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01372.x>
- Li, Y. L., Y. B. Dong, D. Q. Cui, Y. Z. Wang, Y. Y. Liu, M. G. Wei, X. H. Li (2008)** The genetic relationship between popping expansion volume and two yield components in popcorn using unconditional and conditional QTL analysis. *Euphytica* 162:345-351, <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9513-4>
- Li Y. L., Y. B. Dong, S. Z. Niu and D. Q. Cui (2009)** Identification of QTL for popping characteristics using a BC₂F₂ population and comparison with its F_{2:3} population in popcorn. *Agricultural Sciences in China* 8:137-143, [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60020-1](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60020-1)
- Liu Y., Y. Dong, S. Niu, D. Cui, Y. Wang, M. Wei, X. Li, J. Fu, Z. Zhang, H. Chen and Y. Li (2008)** QTL identification of kernel composition traits with popcorn using both F_{2:3} and BC₂F₂ populations developed from the same cross. *Journal of Cereal Science* 48:625-631, <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.02.003>

- Lu H. J., R. Bernardo and H. W. Ohm (2003)** Mapping QTL for popping expansion volume in popcorn with simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 106:423-427, <http://doi/10.1007/s00122-002-1041-y>
- Lodish H., Arnold Berk, Paul Matsudaira, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, Lawrence Zipursky, James Darnell (Eds.) (2008)** Chapter 5: Biomembranes and cell architecture, 147-196 pp. *In: Molecular Cell Biology*. 5th edition, New York, EE.UU: W. H. Freeman. 967 p.
- Michelmore R. W., I. Paran and R. V. Kesseli (1991)** Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:9828-9832.
- Mishra G., D. C. Joshi and P. B. Kumar (2014)** Popping and puffing of cereal grains: A review. *Journal of Grain Processing and Storage* 1:34-46.
- Paes G. P., J. M. S Viana, F. F. E. Silva and G. B. Mundim (2016)** Linkage disequilibrium, SNP frequency change due to selection, and association mapping in popcorn chromosome regions containing QTLs for quality traits. *Genetics and Molecular Biology* 39:97-110, <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0126>
- Park D., K. G. D. Allen, F. R. Stermitz and J. A. Maga (2000)** Chemical composition and physical characteristics of unpopped popcorn hybrids. *Journal of Food Composition and Analysis* 13:921-934, <https://doi.org/10.1006/jfca.2000.0943>
- Rieseberg L. H., M. A. Archer and R. K. Wayne (1999)** Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity* 83:363-372, <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6886170>
- Robbins W. A. and R. B. Ashman (1984)** Parent-offspring popping expansion correlations in progeny of dent corn × popcorn and flint corn × popcorn crosses. *Crop Science* 24:119-121, <https://doi.org/10.2135/cropsci1984.0011183X002400010027x>
- Robles S. R. y R. Covarrubias (1966)** Mejoramiento de la capacidad de expansión en maíces palomeros. *Agrociencia* 1:91-99.
- Sansaloni C., C. Petrolí, D. Jaccoud, J. Carling, F. Detering, D. Grattapaglia and A. Kilian (2011)** Diversity Arrays Technology (DArT) and next-generation sequencing combined: genome-wide, high throughput, highly informative genotyping for molecular breeding of *Eucalyptus*. *BMC Proceedings* 5(Suppl. 7):P54, <http://doi.org/10.1186/1753-6561-5-s7-p54>
- Semagn K, R. Babu, S. Hearne, M. Olsen (2014)** Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Molecular Breeding* 33:1-14, <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9917-x>
- Senhorinho H. J. C., M. M. D. Coan, T. P. Marino, M. C. Kuki, R. J. B. Pinto, C. A. Scapim and J. B. Holland (2019)** Genomic-Wide Association Study of Popping Expansion in Tropical Popcorn and Field Corn Germplasm. *Crop Science* 59:2007-2019, <https://doi.org/10.2135/cropsci2019.02.0101>
- Sherwin, W. B. (2010)** Entropy and information approaches to genetic diversity and its

- expression: Genomic geography. *Entropy* 12:1765-1798, <https://doi.org/10.3390/e12071765>
- Sun Y., J. Wang, J. H. Crouch and Y. Xu (2010)** Efficiency of selective genotyping for genetic analysis of complex traits and potential applications in crop improvement. *Molecular Breeding* 26:493–511, <https://doi.org/10.1007/s11032-010-9390-8>
- Sweley J. C., D. J. Rose and D.S . Jackson (2013)** Quality Traits and Popping Performance Considerations for Popcorn (*Zea mays* Everta). *Food Reviews International* 29:157-177, <https://doi.org/10.1080/87559129.2012.714435>
- Valadez-Gutiérrez J., N. O. Gómez-Montiel, R. E. Preciado-Ortíz, C. A. Reyes-Méndez y A. Peña-Ramos (2014)** V460P, variedad de maíz palomero para la región de Las Huastecas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* (Especial 7):1303-1308, <http://doi/10.29312/remexca.v0i7.1112>
- van der Sman R. G. M. and J. R. Bows (2017)** Critical factors in microwave expansion of starchy snacks. *Journal of Food Engineering* 211:69-84, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.05.001>
- VanRaden P. M. (2007)** Genomic measures of relationship and inbreeding. *Interbull Bulletin* 37:33-36.
- Yi N. and S. Xu (2008)** Bayesian LASSO for quantitative trait loci mapping. *Genetics* 179:1045-1055, <https://doi.org/10.1534/genetics.107.085589>
- Yu J. and E. S. Buckler (2006)** Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current Opinion in Biotechnology* 17:155-160, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.02.003>
- Ziegler K. E. (2001)** Popcorn. In: Hallauer A. R. (ed.) Specialty Corns. Second ed. CRC Press. Boca Raton, FL. pp:199-234.
- Zou C., P. Wang and Y. Xu (2016)** Bulked sample analysis in genetics, genomics and crop improvement. *Plant Biotechnology Journal* 14:1941-1955, <https://doi.org/10.1111/pbi.12559>

DISCUSIÓN GENERAL

El uso de marcadores moleculares como herramienta para auxiliar al mejoramiento genético convencional podría utilizarse en el mejoramiento de las razas mexicanas de maíz palomero para identificar regiones específicas del genoma involucradas en el carácter cuantitativo (QTL); un primer paso es realizar estudios de asociación entre marcadores y el fenotipo para detectar regiones del genoma asociadas al VE, un tipo de población adecuada para estos análisis son las poblaciones segregantes F_2 derivadas de cruzas biparentales entre dos líneas contrastantes en el VE, auxiliadas con estrategias como el análisis de segregantes en masa, el cual consiste en formar dos grupos extremos del fenotipo de interés, pues resulta más económico y con el mismo poder estadístico que analizar toda la población, por lo cual en este estudio se formaron siete cruzas entre una línea palomera \times líneas con endospermo contrastante con el objetivo de generar poblaciones segregantes, evaluar la influencia de cada tipo de endospermo sobre el VE y realizar el análisis de asociación en la población más divergente.

El estudio de la influencia de los tipos de endospermo sobre el VE reveló que la crusa palomero \times cristalino fue superior estadísticamente que las cruzas con los parentales de endospermo dentado y semidentado, pues posee una mayor frecuencia de alelos favorables que incrementan el VE que al cruzarse con la línea palomera confieren una ganancia en la expresión del carácter, lo cual reafirma la hipótesis de que son pocos genes involucrados en la capacidad de reventado del maíz palomero y que esta capacidad está influenciada por las características del endospermo, lo cual concuerda con lo reportado por Babu *et al.* (2006); Borrás *et al.* (2006) y Sweley *et al.* (2013).

En cuanto al número de genes se estimaron de cuatro a cinco genes, que definen el volumen de expansión en las poblaciones analizadas, lo cual reafirma la hipótesis propuesta por investigaciones anteriores (Ashman, 1983; Babu *et al.*, 2006; Coan *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2003; Ziegler, 2001), así mismo, los resultados sugieren que aunque las cruzas de palomero \times dentado y palomero \times semidentado, no superaron a la crusa palomero \times cristalino, es razonable pensar que poseen alelos favorables de efecto aditivo, lo cual se vio reflejado en los individuos transgresivos presentes en todas las poblaciones, lo que concuerda con lo planteado en la teoría de complementariedad de alelos, propuesta por Rieseberg *et al.* (1999), la cual postula que la diferencia en la expresión del carácter radica en la frecuencia de estos alelos y en el caso de la

cruza palomero × cristalino es razonable pensar que la frecuencia de alelos favorables fue mayor, esta teoría sugiere que es factible recuperar el VE con un programa de mejoramiento genético por selección en las razas de maíz palomero mexicanas, las cuales perdieron esa capacidad. Lo anterior fue planteado por Robbins y Ashman (1984), quienes evaluaron la correlación entre el VE y el tipo de endospermo en cruzas de maíz palomero × dentado y palomero × cristalino, concluyendo que, ambos tipos de cruzas presentaron rangos de expansión similares y sugieren que el VE podría recuperarse fácilmente. Una estrategia en el mejoramiento de las razas nativas es seleccionar poblaciones dentro de las razas, con endospermo cristalino que presenten VE superiores a las demás poblaciones, para emplearse en programas de retrocruzamiento o de selección recurrente para lograr las ganancias genéticas deseadas sobre el VE (Vieira *et al.*, 2016).

En este estudio se identificaron loci asociados al volumen de expansión en la cruce palomero × cristalino mediante el análisis de segregantes en masa asistido por marcadores de alta densidad, SNP. Al realizar el estudio de asociación del genoma completo en la Subpoblación 1 (VE bajo) y Subpoblación 2 (VE alto) se encontraron posibles relaciones causales en ocho cromosomas, de los cuales los loci detectados en los cromosomas: 1(3), 3(3), 4(2), 5(3), 7(3) y 8(2) adquieren importancia ya que en algunos casos se detectaron loci cercanos, con efectos positivos y negativos sobre el VE, por lo que se sugiere la presencia de posibles QTL involucrados en el carácter.

Los genes candidatos encontrados por homología de secuencias a través de la herramienta BLAST, en su mayoría correspondieron a genes relacionados con la estructura de la pared celular, factores de transcripción, proteínas asociadas a la membrana y el complejo transportador transmembranal a través de motores moleculares de kinesina, sugiere que las membranas celulares, como la pared celular y el pericarpio, son las estructuras físicas del grano más influyentes sobre el volumen de expansión, lo cual concuerda con los resultados de estudios previos que consideran que la dureza del pericarpio es el factor físico del grano más importante para que se lleve a cabo el proceso de expansión (Borras *et al.*, 2006; Coan *et al.*, 2019; Dong *et al.*, 2015; Ertaş *et al.*, 2008; Gökmen, 2004; Hosney *et al.*, 1983; Park *et al.*, 2000; Paes *et al.*, 2016; Vázquez-Carrillo *et al.*, 2019).

Se sabe que algunas características físicas y morfológicas del grano como tamaño, disposición cristalina en el endospermo, dureza, relación amilosa/amilopectina, un mayor empaquetamiento fibrilar en el pericarpio, porosidad, contenido de humedad y proteínas del endospermo y del pericarpio, influyen de manera decisiva en el reventado y la formación de palomitas en los maíces palomeros, lo que concuerda con los genes candidatos reportados en esta investigación (Borras et al., 2006; Dong et al., 2015; Ertaş et al., 2008; Gökmen, 2004; Hosney et al., 1983; Park et al., 2000).

En otros estudios se ha demostrado que el pericarpio es un factor importante para el proceso de reventado, debido a sus propiedades físicas como la capacidad de transferir calor, siendo el pericarpio en maíces palomeros 2.9 veces más eficiente en la difusión de calor dentro del grano y por la estructura del almidón cristalino, presenta dos veces mayor conductividad que en maíces no palomeros (daSilva *et al.*, 1993; Hosney *et al.*, 1983). En cuanto al proceso de nucleación, se debe considerar la resistencia mecánica del pericarpio; que en maíces palomeros es aproximadamente cuatro veces mayor que en maíces no palomeros, lo que significa que estos granos pueden soportar la presión requerida (9.2 atmósferas) para favorecer este proceso, así como el de apertura celular, ruptura parcial sin una desintegración simultánea y contracción que se presenta al aumentar la temperatura (180°C) lo cual provoca la formación de la palomita que es la conformación final que adquiere el almidón expandido al enfriarse y cristalizarse (Mishra *et al.*, 2014; Sweley *et al.*, 2013; van der Sman and Bows, 2017). Una parte esencial en este proceso es la constitución de las membranas que confiere propiedades únicas por la mezcla de lípidos y proteínas. Así como de los grupos amino y carboxilo de las mismas proteínas transmembrana que participan en la formación del esqueleto de enlaces peptídicos a través de los puentes de hidrogeno que se encuentran en el interior hidrófobo de la membrana, existiendo proteínas que atraviesan la membrana como las porinas que actúan como canales para la circulación de disacáridos, fosfatos u otras moléculas pequeñas y las acuaporinas que permiten la circulación de las moléculas de agua (Lodish *et al.*, 2008).

Los genes candidatos reportados en este estudio muestran una participación en el proceso de expansión del maíz palomero, en alguna de sus fases: nucleación, expansión a través de la apertura del pericarpio, ruptura (parcial) de la célula, contracción del almidón y fijación de la estructura cuando el almidón expandido entra en estado vítreo (Mishra *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES GENERALES

1. La cruza más apropiada para realizar estudios con marcadores moleculares sobre localización de regiones genómicas relacionadas con la capacidad de reventado es con la línea de endospermo cristalino.
2. El número de genes involucrados en el proceso de reventado de maíz palomero es de aproximadamente cuatro.
3. Se detectaron regiones genómicas y variantes alélicas asociadas al volumen de expansión, ubicados en los cromosomas: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 y 10 en algunos casos con más de dos loci.
4. Los genes candidatos reportados en la población analizada mostraron relación con la estructura de la pared celular, factores de transcripción, proteínas asociadas a la membrana y el complejo transportador transmembranal, lo que sugiere que las membranas celulares, como la pared celular y el pericarpio, son las estructuras físicas del grano más influyentes sobre el volumen de expansión.

ANEXO

Apéndice 1

Cuadro A1. Investigaciones realizadas para la localización de QTL relacionados con las características de reventado en maíz palomero.

Carácter	Descripción de la Población			QTL	$\sigma^2 p$ (%)	MM	Cromosoma	Referencia
Volumen de Expansión	[AG19 (H123 × AG19)]	SGP × HD	BC ₁ S ₁	4	45.1	259 SSR	1S, 3S, 5S y 5L	Lu <i>et al.</i> (2003)
	A-1-6 × V273	P × C	F ₂	4	62.0	101 SSR	1, 3, 8, 10 y 1s	Babu <i>et al.</i> (2006)
	Dan 232 × N04	D × P	F _{2:3}	3	31.6	183 SSR	1, 6 y 9	Li <i>et al.</i> (2006)
	Dan 232 × N04	D × P	F _{2:3}	6	54.0	193 SSR	1 (3), 6,7 y 8	Li <i>et al.</i> (2007)
	B104 × BP3	D × P	F _{2:3}	7	82.0	134 SSR	1 (bins 1.05; 1.07), 2, 3, 5, 8 y 9	Dhliwayo (2008)
	Dan 232 × N04	D × P	F _{2:3}	5	45.0	183 SSR	1 (3), 6 y 8	Li <i>et al.</i> (2008)
	Dan 232 × N04	D × P	BC ₂ F ₂	4	27.9	170 SSR	3,5,7 y 8	Li <i>et al.</i> (2009)
	Dan 232 × N04	D × P	F _{2:3} ; BC ₂ F ₂ ; RILs	11	16.9, 25.2, 21.7, 13.5 y 29.5	207 SSR	1,4,6 y 7	Dong <i>et al.</i> (2012)
	Dan 232 × N04	D × P	F _{2:3} ; BC ₂ F ₂ ; RILs	9 mQTL (68QTL)	-	207 SSR	-	Dong <i>et al.</i> (2012)
	Dan 232 × N04	D × P	F _{2:3} ; BC ₂ F ₂ ; RILs	4	-	207 SSR	1 (1.05–1.06, 1.08–1.09) y 7 (7.03–7.04)	Dong <i>et al.</i> (2015)
	Dan 232 × N04	D × P	F _{2:3} ; BC ₂ F ₂ ; RILs	4 mQTL	-	207 SSR	1.01–1.02, 1.06, 6.07–6.08 y 7.03–7.04	Dong <i>et al.</i> (2015)
	Viçosa S4	Palomero	Población	3	-	96 SNP	1,6 y 8	Paes <i>et al.</i> (2016)
	182 Líneas	TMG	LD y LP	4	51.0	165,089 SNP	bins 2.03, 3.06 y 9.03	Senhorinho <i>et al.</i> (2019)

Población D × C: Dentado × Cristalino; D × P: Dentado × Palomero; SGP × D H.: Supergold Popcorn × Híbrido Dentado; TMG: Tropical Maize Germplasm; LD: Líneas endogámicas de maíz dentado; LP: Líneas endogámicas de maíz palomero; GNR: Porcentaje de granos no reventados.

...Continuación de Cuadro A1.

Carácter	Descripción de la Población			QTL	$\sigma^2 p$ (%)	MM	Cromosoma	Referencia
Forma de Palomita	A-1-6 × V273	P × C	F ₂	4	44.0	101 SSR	1,5,9 y 10	Babu <i>et al.</i> (2006)
	Dan 232 × N04	D × P	F _{2:3}	4	34.5	193 SSR	1, 2, 5 y 7	Li <i>et al.</i> (2007)
	Dan 232 × N04	D × P	BC ₂ F ₂	4	28.8	170 SSR	3,5,7 y 8	Li <i>et al.</i> (2009)
	Dan 232 × N04	D × P	F _{2:3} ; BC ₂ F ₂ ; RILs	11	28.21, 19.5, 23.60, 48.5 y 9.8	207 SSR	1,2,4,6, y 10	Dong <i>et al.</i> (2012)
	Dan 232 × N04	D × P	F _{2:3} ; BC ₂ F ₂ ; RILs	8m QTL (64QTL)	-	207 SSR	-	Dong <i>et al.</i> (2012)
	Dan 232 × N04	D × P	F _{2:3}	5	39.1	193 SSR	1 (3), 6 y 8	Li <i>et al.</i> (2007)
Rango de Expansión	Dan 232 × N04	D × P	BC ₂ F ₂	2	19.1	170 SSR	1	Li <i>et al.</i> (2009)
	Dan 232 × N04	D × P	F _{2:3} ; BC ₂ F ₂ ; RILs	11	22.5, 21.7, 16.2 y 22.9	207 SSR	1,4,6 y 10	Dong <i>et al.</i> (2012)
	Dan 232 × N04	D × P	F _{2:3} ; BC ₂ F ₂ ; RILs	7m QTL (60QTL)	-	207 SSR	-	Dong <i>et al.</i> (2012)
GNR	A-1-6 × V273	P × C	F ₂	5	57.0	101 SSR	1, 3, 4, 5 y 9	Babu <i>et al.</i> (2006)
	B104 × BP3	D × P	F _{2:3}	6	66.0	134 SSR	1 (bins 1.03; 1.05), 6, 7, 8 y 9	Dhliwayo (2008)
Peso de Grano	Dan 232 × N04	D × P	F _{2:3}	3	34.5	183 SSR	1, 5 y 7	Li <i>et al.</i> (2008)
	Beija-Flor c4; Viçosa c4	Palomero	Poblaciones	2	-	96 SNP	1 y 7	Paes <i>et al.</i> (2016)

Población D × C: Dentado × Cristalino; D × P: Dentado × Palomero; SGP × D H.: Supergold Popcorn × Híbrido Dentado; TMG: Tropical Maize Germplasm; LD: Líneas endogámicas de maíz dentado; LP: Líneas endogámicas de maíz palomero; GNR: Porcentaje de granos no reventados.

Apéndice 2

Cuadro A2. Localización de SNP asociados significativamente con el VE basados en la estimación del $-\log_{10}$ (P valor) obtenido con el análisis de la Subpoblación 1, con el uso de G + K, de la población F₂ derivada de la cruce CML561 × CML558.

SNP	Cr	Posición	Secuencia	h^2	P valor	FDR	MAF	$-\log$ (P valor)	R ²	Efecto (cm ³ 30g ⁻¹)
100012213 F 0- 17:G>A	1	11953311	TGCAGAAAAAATAGTGGT TACTGGTAAAAAATGAAAA GGTTAAATGGGGTGGACAA GCTAACCTCAGG	0.83	6.76 ⁻⁴	0.37	0.43	3.17	0.70	26.03
29627876 F 0- 65:G>A	5	7700163	TGCAGACACTTTTGAAAAT ATGCTCCACAGTTGGTTCAA CCATGTAAGGCGCACGCTA GTTTCAGCGGTA	0.77	6.50 ⁻³	0.99	0.43	2.19	0.48	-21.26
4589591 F 0-63:C>G	2	7652852	TGCAGGTTTGCCATAGTGG ATGAAGTATAAAGATAAGT TGAAGAAAGAAACTGTACA TCTGACCAGATA	0.75	1.09 ⁻²	0.99	0.49	1.96	0.44	-15.20
4770238 F 0-14:G>A	4	198622843	TGCAGATTTATTTTGCAAAT GATTAGAAAAAGCTAAGAG AAAGGTTGACACTTGACAG TGAGCTACAAA	0.74	1.53 ⁻²	0.99	0.40	1.82	0.41	-13.26
2410910 F 0-20:A>G	8	102775798	TGCAGCAGCTGGGACTGGG AATAGCTTCACGTACGCGG ACCTGCACGCCATCACGGA TGGTTTCTCTGA	0.74	1.56 ⁻²	0.99	0.42	1.81	0.41	-18.80

Cr: Cromosoma; h^2 : heredabilidad del marcador estimada en porcentaje; FDR: Intervalo de estimación de falsos positivos; MAF: frecuencia del alelo menor; R²: proporción de la varianza fenotípica explicada por el SNP expresada en %; Efecto aditivo asociado con el alelo menor.

...Continuación del Cuadro A2.

SNP	Cr	Posición	Secuencia	h^2	P valor	FDR	MAF	-log (P valor)	R ²	Efecto (cm ³ 30g ⁻¹)
4774118 F 0-24:T>G	3	202508053	TGCAGATTTTCATTCTATTC TACATAGATCGAAGTACCC GATGGATTCAGTTTCCATTT CGTTTCTTGA	0.74	1.61 ⁻²	0.99	0.47	1.79	0.41	-16.76
4583309 F 0-12:A>C	4	147827468	TGCAGCAAGCTGATGTCCTC CAAAAGCTAGAGAAGCGAA AAGGAGATGCCTGCAGCAC GCTGTCCTTGC	0.73	2.04 ⁻²	0.99	0.49	1.69	0.39	-14.70
2395757 F 0-5:T>C	7	146875774	TGCAGTCACCAGAAGAAGA AAAATAATTGTAAGCACAT AAATAAAAGAATCAAACCTA CTACCAGCAAAA	0.73	2.25 ⁻²	0.99	0.50	1.65	0.38	10.43
25949110 F 0-26:T>C	11	32	TGCAGCGCGGGCGTCATCG CCATCGATCTGGCCCGCGA CATGAGATCGGAAGAGCGG TTCAGCAGGAAT	0.72	2.39 ⁻²	0.99	0.49	1.62	0.37	14.07
9667547 F 0-28:C>A	1	279082269	TGCAGTTCTAGCATCAGAG CTGGTGGTTCTTTGTAAATG TGATTCTGGAAAGGACACT GCACCTTTGAT	0.72	2.41 ⁻²	0.99	0.48	1.62	0.37	11.70

Cr: Cromosoma; h^2 : heredabilidad del marcador estimada en porcentaje; FDR: Intervalo de estimación de falsos positivos; MAF: frecuencia del alelo menor; R²: proporción de la varianza fenotípica explicada por el SNP expresada en %; Efecto aditivo asociado con el alelo menor.

Cuadro A3. Localización de SNP asociados significativamente con el VE basados en la estimación del $-\log_{10}$ (P valor) obtenido con el análisis de la Subpoblación 2, con el uso de G + K, de la población F₂ derivada de la cruce CML561 × CML558.

SNP	Cr	Posición	Secuencia	h^2	P valor	FDR	MAF	$-\log$ (P valor)	R ²	Efecto (cm ³ 30g ⁻¹)
2497939 F 0-20:C>T	1	299310403	TGCAGTTGAAATCTGTTT TTCCCCTGCAATGTGAAT CAACATAGTTCTGTTGTT TTGATGCAGGAAAGC	0.83	2.63 ⁻³	0.87	0.47	2.58	0.63	-38.09
2382471 F 0-57:C>T	3	232180365	TGCAGCTTCAGGGGTCTC TTGTGGAGTTCTGGACGT TGGCAGTGAGCTTCTAGA GTGCCGTTGCCTTCT	0.80	6.01 ⁻³	0.87	0.46	2.22	0.54	36.32
2442460 F 0-41:G>A	5	199620612	TGCAGAAGGCGTCCCAG ATGGGCTCCAGCGCGAG CGCGCACGGCGGCGTGTC CGTGTTTGGGGGGCTCG	0.79	8.30 ⁻³	0.87	0.50	2.08	0.51	-35.20
100012313 F 0-33:C>T	3	170269576	TGCAGACCAACCAGATTC AACATAAATAAGGTGCC AGTCTCAAACCTTTATTCA GAATGAGATGTCTGAA	0.79	9.83 ⁻³	0.87	0.49	2.01	0.49	-38.40
5585907 F 0-54:G>A	11	67	TGCAGCTCTGAAAATTTT ATGGAGCTAACAATTGTG GAGTTAGGGTGTGTTGACA GGCTTTGACCAACTT	0.79	9.90 ⁻³	0.87	0.44	2.00	0.49	51.40

Cr: Cromosoma; h^2 : heredabilidad del marcador estimada en porcentaje; FDR: Intervalo de estimación de falsos positivos; MAF: frecuencia del alelo menor; R²: proporción de la varianza fenotípica explicada por el SNP expresada en %; Efecto aditivo asociado con el alelo menor.

...Continuación del Cuadro A3.

SNP	Cr	Posición	Secuencia	h^2	P valor	FDR	MAF	-log (P valor)	R ²	Efecto (cm ³ 30g ⁻¹)
2505100 F 0-14:G>C	10	145316326	TGCAGGCACTTCTCGAGC TCCGAGGCCCTGATCCTG TCCGCGTACGACCTCAGC TTCTTGATGGTTCGGA	0.78	1.11 ⁻²	0.87	0.43	1.96	0.48	47.84
2382814 F 0-20:G>A	7	158892468	TGCAGAACAAAACCTTAC CTGTATTTTCCATGTCTA ATGAAGTTATCAGGAAAT GCACAAGCCACAACC	0.78	1.16 ⁻²	0.87	0.47	1.93	0.47	29.92
4582594 F 0-34:T>A	5	69613751	TGCAGCATGTAAGGTTAG CTGCATATGTCCATTTTA AAAACATAGTAGCTGATT AAATGTTAGTCAAGT	0.77	1.65 ⁻²	0.87	0.44	1.78	0.44	-37.50
7049836 F 0-64:G>A	8	4175603	TGCAGCCAGTGCTGTTGC TGATAGAACCATGCCTAG AGATATCCCCTCCAGT TGAGGGCAAAGAGAA	0.76	1.80 ⁻²	0.87	0.48	1.74	0.43	-34.61
4772961 F 0-38:T>C	7	8491422	TGCAGGGCCCTCTCTGAA ATTCCAAATAAACAAC AATTGCTGGAGTAAGAAT TGGCCTAATTAACAAC	0.76	1.87 ⁻²	0.87	0.43	1.73	0.43	34.66

Cr: Cromosoma; h^2 : heredabilidad del marcador estimada en porcentaje; FDR: Intervalo de estimación de falsos positivos; MAF: frecuencia del alelo menor; R²: proporción de la varianza fenotípica explicada por el SNP expresada en %; Efecto aditivo asociado con el alelo menor.