



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**POSGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS**

**“DIVERSIDAD GENÉTICA DE RAZAS MEXICANAS DE MAÍZ DE
ALTITUDES INTERMEDIAS”**

MIRIAM SÁNCHEZ VEGA

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTORA EN CIENCIAS

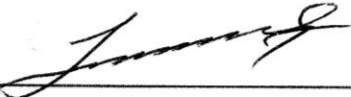
**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO
AGOSTO DE 2014**

La presente tesis titulada "**Diversidad genética de razas mexicanas de maíz de altitudes intermedias**", realizada por la alumna: **Miriam Sánchez Vega**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de.

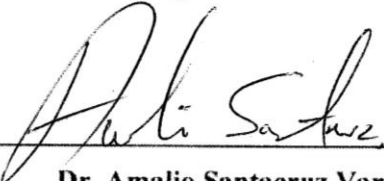
DOCTOR EN CIENCIAS

**RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 

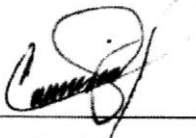
Dr. Leobigildo Córdova Téllez

ASESOR: 

Dr. Amalio Santacruz Varela

ASESOR: 

Dra. Alejandrina Robledo Paz

ASESOR: 

Dra. Ma. Claudia Castañeda Saucedo

ASESOR: 

Dr. Fernando Castillo González

Montecillo, Texcoco, México. Agosto de 2014

DIVERSIDAD GENÉTICA DE RAZAS MEXICANAS DE MAÍZ DE ALTITUDES INTERMEDIAS

Sánchez Vega Miriam, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2014

El maíz es una de las especies cultivadas con mayor diversidad a nivel mundial. México es considerado centro de origen y diversificación. Los patrones de la diversidad de esta especie resultan de la interacción constante de diferentes factores externos e internos, lo que conlleva a generar nueva variabilidad entre las poblaciones o razas, y a establecer un continuo de esta variabilidad dando lugar a diferentes variantes dentro de una misma raza. En este trabajo se caracterizó de manera morfológica y con marcadores moleculares SSR a 88 poblaciones de diez razas mexicanas de maíz (Bofo, Celaya, Coscomatepec, Dulce, Elotes Occidentales, Mushito, Palomero de Jalisco, Serrano de Jalisco, Tablilla de Ocho y Zamorano Amarillo), con la finalidad de examinar y entender las relaciones raciales y la diversidad genética entre y dentro de las poblaciones. Las dos bases de datos de cada análisis (morfológico y molecular) se conjuntaron para hacer un análisis simultáneo y dilucidar de mejor manera las relaciones entre las razas bajo estudio. Con cada análisis fue posible determinar un continuo entre las poblaciones, determinado por aspectos diferentes; en el caso de la caracterización morfológica el continuo se relacionó con aspectos fenotípicos de cada población formando grupos raciales que comparten características morfológicas similares en caracteres poco influenciados por el ambiente. Por otro lado, el continuo apreciado con los marcadores moleculares está relacionado con la ubicación geográfica. La diversidad genética en las razas estudiadas es amplia y confirma interrelaciones raciales por medio de complejos. Las clasificaciones y el estudio de la diversidad estuvo mejor sustentado con el uso simultáneo de caracteres de diferente índole analizados en conjunto.

Palabras clave: *Zea mays* L., razas de maíz, caracteres morfológicos, marcadores moleculares, microsatélites, diversidad genética.

GENETIC DIVERSITY OF MEXICAN MAIZE RACES FROM INTERMEDIATE ALTITUDES

Sánchez Vega Miriam, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2014

Maize is one of the most diverse cultivated species at the global level. Mexico is considered as the center of origin and one of the centers of diversification of maize. The diversity patterns of this species result from the constant interaction of different external and internal factors, which has led to generate new variability among populations or races, and to establish a continuum of this variability, generating different variants within a race. In this study, 88 populations of ten races of Mexican maize (Bofo, Celaya, Coscomatepec, Dulce, Elotes Occidentales, Mushito, Palomero de Jalisco, Serrano de Jalisco, Tablilla de Ocho and Zamorano Amarillo) were characterized using both morphological and SSR molecular markers with the aim of examining and understanding racial relationships and genetic diversity among and within populations. Databases of each analysis (morphological and molecular) were combined to perform a simultaneous analysis and to elucidate in a more comprehensive racial relationships. From each analysis, it was possible to determine a continuum among the populations, determined by different aspects; in case of the morphological characterization the continuum is related to phenotypic aspects of each population forming racial groups that share similar morphological characteristics, especially with those characters slightly influenced by the environment. On the other hand, the continuum detected with molecular markers, is related to geographic location. Genetic diversity is large, and it confirms racial relationships structured into complexes. Classifications and the study of diversity were better supported through the simultaneous use of characters of different nature analyzed in combination.

Index words: *Zea mays* L., maize races, morphological characters, molecular markers, microsatellites, genetic diversity.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado en Ciencias.

Al Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad de continuar con mi formación profesional.

Al Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Producción de Semillas y al personal que labora en el por las facilidades y apoyo brindado durante mi estancia y formación.

Agradezco especialmente a los miembros de mi Consejo Particular por el esfuerzo, la dedicación y tiempo, así como por el apoyo que me han brindado, por sus consejos y adecuados aportes a mi investigación, pero sobre todo por la infinita paciencia y confianza para conmigo ¡Gracias!

De manera muy especial agradezco al Dr. Mario Rocandio Rodríguez, por su tiempo y apoyo en la revisión de las bases de datos y análisis estadísticos y sus consejos.

A todo los que participaron de manera directa e indirecta en el proyecto “Huella genética del maíz”, en la realización de los trabajos de campo y análisis genéticos moleculares. Proyecto que fue financiado por el Sistema Nacional de Recurso Fitogenéticos (SINAREFI).

Dedico esta tesis a:

A mis hijos

Ximena y Héctor Alonso

*Por ser lo más maravilloso que ha llegado a mi vida.
Por ser un gran motivo para seguir adelante contra todo y le doy gracias a Dios
por darme la oportunidad de tenerlos a mi lado y ser parte de mí...
...son mi fortaleza. Los amo hijos*

A mi compañero de vida

Alonso Méndez López

*Por su intenso amor, comprensión, confianza y sobre todo paciencia, por ser
parte importante de mi vida y estar conmigo apoyándome
incondicionalmente...Te Amo*

A mi madre

Rosalba Guadalupe Vega Rodríguez

*Por haberme dado el mejor regalo, la vida. Por apoyarme siempre, en cualquier
momento y circunstancia, por confiar en mí y seguir creyendo.
Por ser la mujer más fuerte que he conocido y por seguir adelante a pesar de las
adversidades y circunstancias...*

A mis hermanos

Lorena, Gerardo y Brenda[†]

*Por su amor, apoyo y comprensión, porque a pesar de las de todo seguimos
juntos, en cuerpo y alma...*

Miriam Sánchez Vega

CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN GENERAL	iii
GENERAL ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vi
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. HIPÓTESIS.....	5
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
4.1. Generalidades del maíz.....	6
4.1.1. Importancia.....	6
4.1.2. Genética del maíz.....	6
4.1.3. Origen del maíz y su diversidad.....	7
4.1.4. Concepto de raza y sus implicaciones en la clasificación y estudio de la diversidad del maíz.....	8
4.1.5. Caracterización de la variabilidad del maíz.....	9
4.2. Tipos de marcadores.....	11
4.2.1. Marcadores morfológicos.....	11
4.2.2. Marcadores genéticos moleculares.....	12
4.2.3. Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR).....	14
4.2.4. SSR empleados en estudios de la diversidad del maíz.....	18
5. LITERATURA CITADA.....	19
CAPÍTULO I. DIVERSIDAD GENÉTICA EN ACCESIONES TIPO DE DIEZ RAZAS MEXICANAS DE MAÍZ DE ALTITUDES INTERMEDIAS	27
1. RESUMEN.....	27
2. SUMMARY.....	28
3. INTRODUCCIÓN.....	29

	Pag.
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
4.1. Material genético.....	30
4.2. Sitios experimentales y ciclos de cultivo.....	31
4.3. Diseño y unidad experimental.....	31
4.4. Caracteres medidos.....	31
4.5. Análisis estadístico.....	32
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
5.1. Análisis de varianza.....	33
5.2. Selección de variables.....	34
5.3. Análisis de componentes principales.....	35
5.4. Análisis de conglomerados.....	38
5.5. Análisis discriminante.....	41
6. CONCLUSIONES.....	42
7. LITERATURA CITADA.....	43
CAPÍTULO II. DIVERSIDAD GENÉTICA DE DIEZ RAZAS MEXICANAS DE MAÍZ MEDIANTE MICROSATÉLITES.....	46
1. RESUMEN.....	46
2. SUMMARY.....	47
3. INTRODUCCIÓN.....	48
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
4.1. Material vegetal.....	49
4.2. Análisis y detección de microsatélites.....	49
4.3. Análisis estadístico.....	52
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
5.1. Parámetros de diversidad genética.....	53
5.2. Diferenciación genética.....	56
5.3. Interrelaciones raciales.....	59
6. CONCLUSIONES.....	65
7. LITERATURA CITADA.....	65

	Pag.
CAPÍTULO III. RELACIONES ENTRE RAZAS MEXICANAS DE MAÍZ DE ALTITUDES INTERMEDIAS POR MEDIO DE ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y MOLECULAR COMBINADOS.....	69
1. RESUMEN.....	69
2. SUMMARY.....	70
3. INTRODUCCIÓN.....	71
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
4.1. Material genético.....	73
4.2. Ubicación del experimento.....	73
4.3. Caracterización morfológica.....	73
4.4. Caracterización molecular.....	74
4.5. Análisis estadísticos.....	75
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	76
5.1. Análisis de componentes principales.....	76
5.2. Análisis de agrupamiento.....	82
5.3. Prueba de Mantel.....	86
6. CONCLUSIONES.....	87
7. LITERATURA CITADA.....	88
CONCLUSIONES GENERALES.....	91

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1.1. Cuadrados medios del análisis de varianza combinado a través de localidades, para 30 caracteres morfológicos. Roque, Celaya, Gto. y Los Paredones, Cd. Guzmán, Jal., México. 2010.....	34
Cuadro 1.2. Estimadores de los componentes de varianza y valor de repetibilidad (r). Roque, Celaya, Gto. y Los Paredones, Cd. Guzmán, Jal., México. 2010...	35
Cuadro 1.3. Vectores propios asociados a los dos primeros componentes principales del análisis de 16 variables, en 88 accesiones tipo de 10 razas de maíz. Roque, Celaya, Gto. y Los Paredones, Cd. Guzmán, Jal., México. 2010...	36
Cuadro 1.4. Probabilidad de las accesiones evaluadas de pertenecer a una de las 10 razas de maíz, mediante análisis discriminante.....	41
Cuadro 2.1. <i>Loci</i> de microsatélites e iniciadores con etiqueta fluorescente utilizados para la amplificación de SSR en poblaciones de 10 razas de maíz.....	51
Cuadro 2.2. Parámetros de diversidad genética correspondiente a diez razas de maíz y dos teocintles con 31 <i>loci</i> de microsatélites.....	54
Cuadro 2.3. Estadísticos <i>F</i> y flujo génico calculado a partir de 31 <i>loci</i> de microsatélites para 10 razas mexicanas de maíz y dos teocintles.....	57
Cuadro 2.4. Primeros 10 componentes principales (CP) y porcentaje de la varianza acumulada para 87 poblaciones de diez razas de maíz y dos de teocintle a partir de 31 <i>loci</i> de microsatélites.....	59
Cuadro 3.1. Componentes principales (CP), valores propios y porcentaje de la varianza global explicada y acumulada a partir de información conjunta	

	Pag.
de 16 variables morfológicas y de polimorfismo de 200 <i>loci</i> SSR.....	76
 Cuadro 3.2. Variables de mayor importancia en los vectores característicos de CP1 y CP2 generados para 87 poblaciones de maíz pertenecientes a diez razas mexicanas de maíz a partir de información combinada de tipo morfológico y de polimorfismo de SSR.....	 78

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
<p>Figura 1.1. Dispersión de 88 accesiones representativas de 10 razas de maíz con base en los dos primeros componentes principales. B= Bofo, CE= Celaya, CO= Coscomatepec, D= Dulce, E= Elotes Occidentales, M= Mushito, P= Palomero de Jalisco, S= Serrano de Jalisco, T= Tablilla de Ocho, Z= Zamorano Amarillo.....</p>	37
<p>Figura 1.2. Dendrograma de 88 accesiones de 10 razas de maíz, construido con el método UPGMA usando distancias euclidianas con 16 variables morfológicas. B= Bofo, CE= Celaya, CO= Coscomatepec, D= Dulce, E= Elotes Occidentales, M= Mushito, P= Palomero de Jalisco, S= Serrano de Jalisco, T= Tablilla de Ocho, Z= Zamorano Amarillo.....</p>	40
<p>Figura 2.1. Número de alelos totales por <i>locus</i> y número de alelos exclusivos, para cada uno de los 31 marcadores SSR, obtenidos del análisis en 89 poblaciones mexicanas pertenecientes a diez razas de maíz y dos teocintles.....</p>	55
<p>Figura 2.2. Diagrama de dispersión de 89 poblaciones representativas de 10 razas mexicanas de maíz y dos razas de teocintles con base en los componentes principales CP1, CP2 y CP4. TC= teocintle raza Chalco, TB= teocintle raza Balsas, B= Bofo, CE= Celaya, CO= Coscomatepec, D= Dulce, E= Elotes Occidentales, M= Mushito, P= Palomero de Jalisco, S= Serrano de Jalisco, T= Tablilla de Ocho, Z= Zamorano Amarillo.....</p>	61
<p>Figura 2.3. Árbol filogenético generado con distancias genéticas modificadas de Rogers con base en 200 alelos SSR, con el método de agrupamiento de Neighbor-Joining. TC= teocintle raza Chalco, TB= teocintle raza Balsas, B= Bofo, CE= Celaya, CO= Coscomatepec, D= Dulce, E= Elotes Occidentales, M= Mushito, P= Palomero de Jalisco, S=Serrano de Jalisco,</p>	

	Pag.
T= Tablilla de Ocho, Z= Zamorano Amarillo.....	64
 Figura 3.1. Distribución de 87 poblaciones de maíz perteneciente a diez razas mexicanas sobre el plano bidimensional de los CP1 y CP2. B= Bofo, CE= Celaya, CO= Coscomatepec, D= Dulce, E= Elotes Occidentales, M= Mushito, P= Palomero de Jalisco, S= Serrano de Jalisco, T= Tablilla de Ocho, Z= Zamorano Amarillo.....	79
 Figura 3.2. Árbol filogenético construido con distancias de Gower derivadas de 200 alelos SSR y 16 caracteres morfológicos mediante el método de agrupamiento Neighbor-Joining. B= Bofo, CE= Celaya, CO= Coscomatepec, D= Dulce, E= Elotes Occidentales, M= Mushito, P= Palomero de Jalisco, S= Serrano de Jalisco, T= Tablilla de Ocho, Z= Zamorano Amarillo, PT= Palomero Toluqueño.....	83

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México es reconocido como un país megadiverso a nivel mundial; es el quinto de los 12 países que poseen más del 70% de la diversidad de animales y plantas (Llorente-Bousquets y Ocegueda, 2008).

Una de las especies cultivadas con mayor diversidad en México es el maíz (*Zea mays* L.); se han descrito alrededor de 65 razas y cientos de variantes adaptadas a condiciones ambientales, regiones geográficas y sistemas agrícolas específicos, así como a variados contextos culturales y económicos; se encuentra resguarda, recreada, conservada y usada principalmente por los pueblos indígenas, y comunidades campesinas en prácticamente todo el territorio nacional. La diversidad del maíz en México es muy amplia y se encuentra en constante evolución bajo domesticación; es acompañada de la diversidad del teocintle que constituye al pariente silvestre más cercano a este cultivo; por lo tanto es la agrobiodiversidad, integridad a las condiciones políticas, culturales, ecológicas y económicas de los pueblos originarios, en constante resistencia ante la sociedad nacional y la cultura dominante (Salgado, 2011).

La diferenciación del maíz en razas se debe tanto a la diversidad de pisos ecológicos como a las culturas locales que lograron su adaptación y selección disruptiva en base a los usos específicos (Vélez y García, 2011), de esta forma los atributos observados en cada una de las razas de maíz es resultado de los intereses y acciones de los agricultores, la cual se puede detectar examinando el sistema de clasificación que los agricultores usan para describir a las variantes que cultivan (Bellon y Risopoulos, 2001). La diversidad del maíz en México está ligada íntimamente a la vida y condición de los pueblos indígenas y campesinos, su clasificación pudiera basarse en una taxonomía autóctona, en la forma y en los diversos usos, incluidos los religiosos. Pero también existe en México una completa clasificación del maíz basada en la convención universal de razas y variedades (Salgado, 2011).

Desde el punto de vista biológico, los procesos que generan y mantienen la diversidad genética del maíz son muy dinámicos, entre estos está la mutación, la selección y la recombinación, ligados a las necesidades de largo plazo de las poblaciones humanas en crecimiento y sus cada vez mayores expectativas de vida. Esto ha dado pie a tener una variación continua en la diversidad del maíz, sobre todo en sus caracteres cuantitativos; como consecuencia, la mayoría de las poblaciones estudiadas son variantes intermedias entre lo que se ha descrito como típico de las razas (Kato *et al.*, 2009). La dispersión del maíz y el uso de la semilla propia, han formado muchas subpoblaciones que, aunque similares en apariencia, son diferentes en las frecuencias de sus genes para las características que condicionan la adaptación del maíz a cada lugar de su cultivo (Salgado, 2011).

Existen muchos estudios relacionados con la clasificación de la diversidad del maíz tomando como criterio la identificación de razas. Algunos de los primeros trabajos fueron los de Sturtevant (1899), Chávez (1913), Anderson y Cutler (1942), Wellhausen *et al.* (1951), Hernández y Alanís (1970); entre los trabajos más recientes se pueden citar a Sánchez *et al.* (2000), Herrera-Cabrera *et al.* (2004), Vigoroux *et al.* (2008), Bedoya *et al.* (2010), Zerjal *et al.* (2012), por citar algunos; sin embargo, se puede considerar que el exhaustivo estudio de esta especie aún está inconcluso, ya que se encuentra en constante interacción entre sus variantes locales, así como entre las regiones ecológicas que a través de la selección se encuentran en un proceso evolutivo muy dinámico, generando nuevas variantes que posiblemente constituyen razas aún no descritas (Muñoz, 2003).

La situación descrita conlleva a la imperiosa necesidad de continuar con los estudios del maíz, sobre su diversidad y clasificación, que permita entender su dinámica y con esa base plantear los esquemas de mejoramiento genético y de conservación de éste recurso fitogenético. Varios trabajos realizados en maíz, sobre todo en clasificación han tratado de subsanar el proceso para clasificar una población de maíz dentro de alguna de las razas previamente establecidas, pues muchas veces se basa completamente en la experiencia del investigador, quien compara la morfología de la población objeto con la descripción en la literatura para plantear su clasificación.

La clasificación en maíz se ha basado principalmente en descripción morfológica; sin embargo, tanto los caracteres morfológicos como los moleculares presentan ventajas y desventajas que los investigadores deben considerar. Desde que los datos moleculares (aloenzimas, secuencias de DNA) se incorporaron a los análisis filogenéticos, ha existido un debate sobre si éstos o los morfológicos resultan mejores como fuente de información para dichos análisis (Patterson *et al.*, 1993).

En los estudios basados en caracteres morfológicos, frecuentemente se emplean guías y descriptores básicos que permiten conocer la diversidad genética del maíz en forma rápida y sencilla; sin embargo, muchos caracteres morfológicos se ven afectados por baja heredabilidad y alta interacción con el ambiente, ya que influye en la expresión del fenotipo, por lo que en muchos casos se requieren de nuevos métodos para realizar los estudios de diversidad del maíz (Khush, 2001).

La aparición de los marcadores moleculares, como el caso de los microsatélites (secuencias simples repetidas o SSR, por sus siglas en inglés), y su aplicación en análisis genéticos y estudios de diversidad ha sido de gran valor para ampliar el conocimiento logrado con estudios morfológicos (Warburton *et al.*, 2002). Los SSR se caracterizan por ser altamente polimórficos, que se encuentran distribuidos al azar a lo largo del genoma son somáticamente estables y codominantes (Junjian *et al.*, 2002). Su uso ofrece ventajas sobre la información morfológica y sobre el uso de otros marcadores moleculares para la delimitación de grupos o complejos raciales y la asignación de poblaciones o accesiones de maíz dentro de grupos. El conocimiento de la diversidad genética del maíz por medio de marcadores moleculares puede ser importante para trabajos de mejoramiento genético y conservación (González *et al.*, 2009).

Algunos autores han sugerido conjuntar información de variables de diferente tipo como morfológicas, bioquímicas y moleculares, para obtener análisis más precisos, que permitan mayor resolución en la clasificación de accesiones dentro de razas y establecer complejos raciales (Sánchez *et al.*, 2000; Santacruz-Varela *et al.*, 2004; Mijangos-Cortés *et al.*, 2007). Cuando se combinan dos conjuntos de datos de diferente naturaleza, tal es el caso de continuos vs discretos o morfológicos vs moleculares, la resolución en los estudios de clasificación racial,

interrelación racial o de diversidad genética, en maíz es mejor; por otro lado, también es correcto que en análisis combinado, casi siempre se lleven a cabo análisis separados de subconjuntos de información, además del análisis combinado (Chippindale y Wiens, 1994).

Los caracteres morfológicos pueden auxiliar cuando la variación molecular es limitada y la homología de los datos moleculares no es clara; de esta manera, estudios que incorporen a ambos darán mejores descripciones e interrelaciones de la diversidad biológica que los que se enfocan sólo en uno de los dos tipos de caracteres (Moritz y Hillis, 1996). Se pueden combinar conjuntos de datos distintos en una misma matriz, con la premisa de maximizar la eficiencia descriptiva y el poder explicativo de la información total (Kluge y Wolf, 1993).

Lo anterior pone de manifiesto que el estudio en maíz es virtualmente infinito debido a la gama de variantes que se tiene en esta especie y que los estudios bien fundamentados siempre aportarán información que ayuda a explicar y entender la diversidad genética e interrelaciones raciales de esta especie. El realizar estudios tanto morfológicos como moleculares en maíz en forma independiente va a depender de los objetivos de cada trabajo y los recursos con los que se cuente; sin embargo, éstos aportaran nuevos elementos en el entendimiento de la distribución racial y la diversidad genética del maíz en México (Kato *et al.*, 2009). Al conjuntar todo tipo de información (social, cultural, morfológica, fisiológica, citológica, geográfica, antropológica, genética, molecular), y con el apoyo de recursos computacionales y estadísticos potentes, se genera una herramienta eficiente auxiliar en la clasificación de nuevas accesiones, definición de nuevas razas, conjunción de razas hasta ahora declaradas como diferentes en una sola, y en el entendimiento de la diversidad genética de esta especie e incluso su origen.

Con el contexto anterior en el presente trabajo se estudiaron 88 poblaciones de maíz con enfoque morfológico y molecular y la combinación de ambos con la finalidad de examinar y entender las interrelaciones raciales y la diversidad genética de 10 razas mexicanas de altitudes intermedias (Bofo, Celaya, Coscomatepec, Dulce, Elotes Occidentales, Mushito, Palomero de Jalisco, Serrano de Jalisco, Tablilla de Ocho y Zamorano Amarillo), y de esta forma aportar información más abundante y precisa para tener mayor capacidad de discernir entre poblaciones y razas.

2. OBJETIVOS

- a.** Estimar la diversidad genética entre y dentro de poblaciones pertenecientes a 10 razas mexicanas de maíz con adaptación a altitudes intermedias, mediante el uso de marcadores morfológicos (fenotipo).
- b.** Examinar la diversidad genética entre y dentro de poblaciones pertenecientes a 10 razas mexicanas de maíz, mediante el uso de marcadores moleculares SSR.
- c.** Analizar las interrelaciones raciales, con base en la similitud entre las poblaciones y grupos de poblaciones que formen las 10 razas de maíz estudiadas, por medio de la caracterización morfológica y molecular.

3. HIPÓTESIS

- a.** Es posible diferenciar grupos de poblaciones bien definidos con base en sus características morfológicas y su estructura genética que caracteriza a cada raza.
- b.** Existe variabilidad genotípica amplia entre y dentro de poblaciones de las razas de maíz estudiadas, que permite diferenciar grupos interraciales con base en sus características genéticas moleculares.
- c.** Las interrelaciones raciales entre las diferentes poblaciones de maíz presentan mayor coherencia y son más explicativas cuando en el análisis se combinan los caracteres morfológicos y moleculares que en forma independiente.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Generalidades del maíz

4.1.1. Importancia

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los tres cereales más importantes del mundo, que en volumen de producción supera al trigo y al arroz; se produce en casi 100 millones de hectáreas de 125 países. En México este cultivo es de gran importancia por su historia, tradición e impacto social y económico; donde se siembran 6.9 millones de hectáreas, con una producción de 22.07 millones de toneladas (FAOSTAT, 2014).

México es considerado el centro de origen y domesticación del maíz (Matsuoka *et al.*, 2002). Es aceptado que esta especie se domesticó hace cerca de 10,000 años a partir de una subespecie de teocintle (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) y se dispersó a través del continente americano; asimismo, este cereal ha sido una fuente muy importante de calorías en otros continentes. En la mayor parte de los países de América, el maíz constituye la base histórica de la alimentación y uno de los aspectos centrales de las culturas mesoamericana y andina (Vigoroux *et al.*, 2008).

La variabilidad genética de maíz constituye una riqueza para la población mundial, y puede ser la base para lograr la soberanía alimentaria de México, en especial ante los cambios climáticos (Castillo, 2011). La evaluación de dicha diversidad es importante para los programas de mejoramiento genético, por su potencial como fuente de características nuevas, exóticas y favorables (Vigoroux *et al.*, 2008).

4.1.2. Genética del maíz

El genoma de maíz presenta una dotación diploide de veinte cromosomas, cuyas longitudes no resultan significativamente diferentes entre sí; además, tiene 50 a 60 mil genes y alrededor de 2 500 millones de bases nitrogenadas (Kato, 1984; Maya *et al.*, 2005).

4.1.3. Origen del maíz y su diversidad

Existen diversas teorías sobre el origen geográfico del maíz, las cuales han circulado en los últimos años, cada una con sus defensores y detractores, basados unos y otros en estudios, descubrimientos y constataciones arqueológicas, históricas, botánicas, etc. (Sánchez, 1989).

A través del tiempo se ha avanzado de manera extraordinaria en entender las interrelaciones y semejanzas entre las razas de maíz y su diversidad; sin embargo, es difícil establecer las épocas y la dirección de la dispersión que permitió mantener las similitudes y favorecer diferencias que existen en la actualidad en esta especie. Mesoamérica ha sido considerada como un área cultural importante de origen y domesticación del maíz; Weaver (1981) afirmó que esta región mantuvo relaciones con las áreas vecinas y de esta forma se extendió el maíz a todo el continente.

La diversidad del maíz es un ejemplo excepcional de la interacción de la humanidad con los recursos naturales disponibles. El proceso se ha iniciado hace más de seis mil años, y operado inicialmente sobre sus ancestros silvestres, centralmente el teocintle; de esta forma, el producto es una extraordinaria diversidad de formas, texturas, colores, comportamientos y adaptaciones geográficas de las variedades de maíz, diversidad con la que muy pocas especies cultivadas se le compara (Kato *et al.*, 2009).

El proceso de diversificación del maíz ocurrió simultáneamente en diversas regiones y se extendió prácticamente a todo el territorio nacional y fuera de él; a lo que se le conoce como la teoría multicéntrica del origen del maíz (Kato *et al.*, 2009; McClintock *et al.*, 1981; Kato, 1984). Probablemente esta teoría es la única que parece explicar adecuadamente cómo pudo generarse la gran variación racial y su distribución geográfica existente en México, en cinco centros de origen y domesticación diferentes; haciendo que en determinados territorios convergieran más de un germoplasma original promoviendo una mayor diversificación racial (Kato *et al.*, 2009).

Actualmente, se considera que existen en el continente americano entre 220 y 300 razas de maíz (Brown y Goodman, 1977; Vigouroux *et al.*, 2008); en México, el número varía con el

autor, reportándose 41 (Ortega *et al.*, 1991), 59 (Sánchez *et al.*, 2000) y 65 (LAMP, 1991) razas. Según estimación de Ortega (2003) el número de razas de maíz en México puede ser mayor que lo establecido conforme se vayan haciendo nuevas colecciones de muestras, principalmente en regiones mal comunicadas del país.

El estudio sistemático de la variación racial del maíz existente en México se inició en la primera mitad del siglo XX (Vavilov, 1951; Anderson y Cutler, 1942); en 1951 se publicó un trabajo más exhaustivo sobre la variación racial y su distribución geográfica del maíz en México (Wellhausen *et al.*, 1951) en el que se describen 25 razas; a partir de esa fecha siguieron otros como los de Hernández y Alanís (1970), Ortega (1985), Ortega *et al.* (1991), Benz (1986), Sánchez (1989), sobre diversidad genética y descripción de las razas de maíz; sin embargo, el número de razas descritas y los estudios al respecto se siguen incrementando (Sánchez *et al.*, 2000).

4.1.4. Concepto de raza y sus implicaciones en la clasificación y estudio de la diversidad del maíz

En maíz se han delineado patrones de variación que responden tanto a condiciones agroecológicas como a la diversidad cultural de los grupos humanos que lo han cultivado; de tal forma que se han determinado poblaciones diferenciadas unas de otras; y cuando esas diferencias son contrastantes, se aplica el concepto de raza para valorar la diversidad genética; una raza se define como *“un grupo de individuos relacionados con suficientes características en común para permitir su reconocimiento como grupo”* y desde una perspectiva genética *“una raza es un grupo de individuos con un número significativo de genes en común”* (Anderson y Cutler, 1942). Así entonces las clasificaciones de maíz han tenido trasfondo, en este concepto que encierra un cierto grado de flexibilidad, debido a que se visualiza a una raza como un fondo genético general aplicado a un grupo completo, aunque éste pudiera presentar variación individual, de manera que se conceptualiza una raza como una fotografía compuesta de un grupo de poblaciones.

Al igual que el número de las razas de maíz se ha incrementado con el paso de los años, el concepto de raza también se ha ido enriqueciendo, de esta forma Brieger *et al.* (1958) definieron

el término de raza como “*un grupo de poblaciones que tienen suficiente número de características distintivas en común, manteniéndose estas a través de reproducción panmíctica dentro de la población y ocupando áreas definidas*”; sin embargo, este concepto no se contradice en lo fundamental con el concepto vertido por Anderson y Cutler (1942), más bien lo complementa, incorporando la componente geográfica; de esta forma, Ron *et al.* (2006) concluyen que raza puede definirse como “*una población con un alto número de características y genes en común, que la distinguen como grupo y la diferencian de otras poblaciones; que puede transmitir con fidelidad sus características a las generaciones siguientes y que ocupa un área ecológica específica*”.

Ford-Lloyd y Jackson (1986) consideran que los patrones de diversidad genética de las plantas cultivadas resultan de la interacción de los factores principales siguientes: mutación, migración, recombinación, selección y deriva genética. Los tres primeros estimulan la producción de nueva variabilidad, mientras que los dos restantes pueden reducirla. De acuerdo con Hidalgo (2003), existen diferentes fuentes de variabilidad como la producida durante los procesos evolutivos de especiación, la variabilidad producida por la dispersión artificial ejercida por el hombre y la variabilidad producto de la dinámica de inducción-selección de nuevas variantes por medio de la hibridación, como lo mencionan Wellhausen *et al.* (1951).

Al considerar la variabilidad genética de maíz en México, se ha demostrado que está ampliamente asociada a las condiciones agroecológicas de una comunidad en particular, incluso que cada familia posee diversidad en tipos de maíz, lo que lleva a establecer que existe interacción constante entre las diferentes poblaciones, que puede dar lugar a diferentes variantes dentro de la misma raza e incluso nuevas razas como lo sugieren Herrera-Cabrera *et al.* (2004).

4.1.5. Caracterización de la variabilidad del maíz

La caracterización en plantas es considerada como la determinación del conjunto de caracteres para diferenciarlas taxonómicamente (López-Santiago *et al.*, 2008) o para determinar su diversidad. En el estudio de una especie se estima la variabilidad existente en el genoma de la población de individuos que la conforman. El objetivo principal es medir

la variabilidad genética de una colección de muestras mediante el uso de descriptores definidos. Otros objetivos son el establecimiento de la representatividad de la colección, la investigación de la estructura genética a través de la determinación de poblaciones identificables, la identificación de duplicados dentro de una colección y la identificación de genes especiales, alelos particulares o frecuencias alélicas (Hidalgo, 2003).

La variabilidad se almacena en el genoma; es decir, variantes entre los miembros de la población que conforman la especie, y puede o no expresarse en características que permitan ser identificadas. Por tanto, desde el punto de vista de su expresión, la variabilidad contenida en el genoma de una especie puede ser agrupada en dos grandes clases: (1) la que se expresa en características visibles y que conforman el fenotipo, y (2) la que no se expresa, pero es posible visualizarla con herramientas especiales y que en general se refiere a los procesos o productos internos de la planta; muchos procesos en esta última clase están siendo identificados mediante técnicas de biología molecular. Es necesario distinguir entre lo que puede o no ser expresado en forma visual, con el fin de precisar qué porción de la variabilidad total de la especie se está analizando al caracterizar (Hidalgo, 2003).

Para la evaluación de la diversidad genética se ha planteado que la determinación de una raza puede lograrse mediante diferentes estrategias; como el estudio de caracteres agronómicos, morfológicos, fenológicos y de distribución geográfica (Anderson y Cutler, 1942; Wellhausen *et al.*, 1951; Hernández y Alanís, 1970; Ortega, 1973), de los cuales han predominado los caracteres morfológicos y citogenéticos (Kato, 1988; McClintock *et al.*, 1981), los cuales permitieron establecer patrones de relaciones genealógicas preliminares en maíz y constituye la base del conocimiento de la diversidad de este cultivo y ha servido hasta ahora como patrón en la descripción de las razas. Posteriormente, el uso de marcadores bioquímicos como las isoenzimas (Doebley *et al.*, 1985; Goodman y Brown, 1988; Sánchez *et al.*, 2000), y con marcadores moleculares, tales como los microsatélites (Matsuoka *et al.*, 2002; Reif *et al.*, 2006; Zerjal *et al.*, 2012), han ampliado el entendimiento de los estudios de diversidad, definición de las razas en maíz y sus relaciones; de igual forma, gracias al desarrollo de métodos estadísticos multivariados ejecutados por computadora, fue posible incorporar de manera simultánea un mayor número de caracteres aplicando técnicas de taxonomía numérica, donde Goodman (1972), Goodman y Bird

(1977) y Cervantes *et al.* (1978) incorporaron efectos de interacción genotipo-ambiente. La clasificación por taxonomía numérica es una herramienta de gran utilidad para integrar la variación multivariada de los atributos y conocer las interrelaciones entre las variantes del maíz (Castillo, 1993); asimismo, los polimorfismos de marcadores bioquímicos y moleculares han dado realce a los estudios de clasificación racial y diversidad genética en maíz.

Las características químicas del grano y el análisis de metabolitos secundarios también han permitido definir con mayor precisión la variación racial presente en maíz (Hernández, 1986; Classen *et al.*, 1990; Reid *et al.*, 1991; Arnason *et al.*, 1994; Sánchez *et al.*, 2000; Pressoir y Berthaud, 2004).

4.2. Tipos de marcadores

Un marcador es cualquier carácter con diferencias entre individuos controladas genéticamente; se puede considerar que cualquier molécula orgánica, que sea característica de un organismo o proceso sea un marcador (Azofeita-Delgado, 2006). Los marcadores genéticos son un fragmento de ADN que tiene una ubicación específica en un cromosoma; dichos fragmentos pueden ser heredados, y no necesariamente deben tener una función específica. Los marcadores genéticos se dividen en: marcadores morfológicos, este tipo de marcadores son caracteres que se expresan en un ambiente específico, el fenotipo y puede ser modificado por el ambiente; y en marcadores moleculares, son fragmentos de ADN que pueden o no expresarse (Nuez y Carrillo, 2000).

4.2.1. Marcadores morfológicos

En relación con el fenotipo, los caracteres que lo conforman corresponden en su gran mayoría a la descripción morfológica de la planta y su arquitectura. Estos caracteres se denominan descriptores morfológicos (Hidalgo, 2003).

Los marcadores morfológicos fueron el primer tipo de marcadores que el hombre utilizó; los cuales incluyen caracteres de un individuo que se expresan en un ambiente específico y que

el hombre identifica con un objetivo determinado; la variación en estructuras reproductivas, como ejemplo, se consideran marcadores ya que se ha visto que dichas características se asocian en la mayoría de las poblaciones con la supervivencia, el crecimiento y la reproducción, entre otros (Nuez y Carrillo, 2000).

Este tipo de marcadores son muy utilizados para estimar la variación morfológica existente en una población; sin embargo, hay varias limitaciones para su uso, como que se basan en las características morfológicas o expresadas en el individuo (fenotipo) que son fuertemente influenciadas por el ambiente en que se desarrollan, además de que generalmente sólo se pueden identificar y medir en individuos completos o una fase del desarrollo del individuo específica (Nuez y Carrillo, 2000).

Los marcadores morfológicos y de rendimiento han sido tradicionalmente utilizados para estimar distancias génicas en plantas. No obstante, las características fenotípicas no arrojan resultados certeros sobre la composición genotípica de los individuos, como ejemplo se tiene la cantidad de granos por espiga en los cereales, dicho carácter, es producto de la expresión combinada de varios genes, fuertemente influenciado por el medio ambiente y por el hombre (González y Simpson, 1991).

4.2.2. Marcadores genéticos moleculares

Estos marcadores genéticos moleculares son fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis, permiten la identificación de variantes y están libres de los efectos epistáticos (Azofeita-Delgado, 2006).

Dentro de los marcadores moleculares se menciona la existencia de dos tipos: los bioquímicos (principalmente las isoenzimas) y los marcadores de ADN (Montalvo, 1998).

Un marcador molecular se refiere a cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas utilizando electroforesis o cromatografía, y un marcador genético molecular es cualquier gen cuya expresión permite un efecto fenotípico que puede ser detectado fácilmente. Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos (Valadez y Kahl, 2005). Las técnicas empleadas para su estudio y análisis son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Azofeita-Delgado, 2006).

La utilización de fragmentos del ADN cromosómico como marcadores genéticos refleja diferencias tangibles entre las secuencias homólogas del ADN de los organismos. Todo organismo diploide contiene dos copias de cada cromosoma, uno que proviene del padre y otro de la madre, las cuales son parecidas, excepto por alguna diferencia pequeña que se presente en la secuencia del ADN entre ambos progenitores, llamada polimorfismo del ADN. Estos polimorfismos pueden localizarse en una región codificante o no codificante y son la base molecular que determina genéticamente las diferencias fenotípicas entre los individuos (Berumen, 1993), y revelan la ocurrencia de cambios genéticos o rearrreglos de los pares de bases o nucleótidos (pb) entre dos o más individuos y que idealmente son representativos a nivel del genoma completo (Agarwal *et al.*, 2008). Los cambios que se presentan van desde el cambio de un nucleótido en la secuencia de ADN, hasta translocaciones, inversiones, o inserciones de segmentos de ADN (Valadez y Kahl, 2005).

Los marcadores genéticos moleculares permiten la caracterización detallada del patrón de bandeo obtenido al finalizar cualquier técnica desarrollada para tal fin. Este perfil de bandas es también conocido como huellas genómicas. Un marcador genético puede ser cualquier *locus* en el genoma que, de existir variaciones del mismo entre distintos individuos, permita distinguir a cada portador de una variante de dicho *locus* del resto de la población. Si la modificación es muy poco frecuente, habitualmente se la denomina mutación, pero si ésta es frecuente se le denomina polimorfismo. La cuantificación del polimorfismo permite determinar la capacidad discriminatoria de dichos *loci* (Valadez y Kahl, 2005).

La utilidad del uso de marcadores de ADN se fundamenta en una extensa tecnología utilizada para definir los polimorfismos del ADN (Tingey y Tufo, 1993). Dichas tecnologías están basadas en un sin número de principios y metodologías; tales como corte del ADN con enzimas de restricción, clonación, hibridación, tinción, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación, entre otras (Montalvo, 1998).

La elección de la técnica para generar alguna clase de marcador genético para un proyecto en particular depende de muchos factores. Primero, considerar los objetivos y/o alcances del trabajo, incluyendo el tipo de población a evaluar; cantidad de material biológico disponible; genética del carácter y del organismo a ser estudiado; el costo o recursos económicos y equipo disponibles; incluso, considerar la complejidad de cada técnica, con el fin de seleccionar la más adecuada para el cumplimiento de los objetivos de la investigación (Balbás, 2002).

4.2.3. Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR)

Los SSR (secuencias simples repetidas, por sus siglas en inglés) son regiones hipervariables que se componen de secuencias de ADN con repeticiones cortas de 1 a 6 pb; presentan variación altamente polimórfica, reproducible y de herencia codominante. Son particularmente útiles debido a su alta variabilidad, son abundantes en la mayoría de los genomas de eucariontes, están distribuidos a lo largo del genoma (Becher *et al.*, 2000). Estas secuencias se amplifican por medio de PCR utilizando iniciadores específicos para las regiones que flanquean las secuencias repetidas. La interpretación de los polimorfismos está basada en la variabilidad del número de secuencias repetidas y en consecuencia, por el tamaño de los fragmentos amplificados. Esta técnica permite detectar diferencias hasta de una base, que corresponde al mínimo de longitud en un polimorfismo (Picca *et al.*, 2004). Es factible la semiautomatización y pueden ser identificados en bases de datos (Hernández, 2005); además se pueden analizar varios *loci* a la vez (Contreras, 2011).

Para la aplicación de marcadores basados en microsatélites, el ADN extraído se amplifica utilizando iniciadores definidos. Para diseñar los iniciadores apropiados para cada especie u organismo de estudio, se requiere de bibliotecas genómicas y clones secuenciados para diseñar

dichas sondas que permitirán su amplificación en el genoma; también se necesita secuenciar la(s) zona(s) que se desee amplificar. Los resultados son visualizados como patrones de bandas en un gel por medio de electroforesis, y en el caso de marcar los iniciadores con fluorescencia, se pueden visualizar en un secuenciador, por medio de electroforesis capilar (Valadez y Kahl, 2005).

Los SSR se han utilizado extensamente para estudios de diversidad genética y en la descripción de la estructura genética de poblaciones, así como para generar huellas genéticas, por tener alta confiabilidad, reproducibilidad y automatización (Bedoya *et al.*, 2010). También han permitido caracterizar materiales mejorados, complejos genéticos, variedades de polinización abierta y materiales nativos (Matsuoka *et al.*, 2002; Reif *et al.*, 2006; Vigoroux *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2010; Wen *et al.*, 2012).

Existe una gran cantidad de estudios basados en marcadores genéticos que requieren el análisis de varios *loci* por PCR, como es el caso de los SSR, por lo que cuando se trabaja con un gran número de marcadores, o bien un gran número de muestras a evaluar, es preferible amplificar todas o varias de las secuencias de interés de forma simultánea en una reacción de PCR múltiple, permitiendo de esta manera economizar en costos, material genético y tiempo (Contreras, 2011).

Los SSR presentan la ventaja de que el número de *loci* por reacción se puede incrementar por medio de análisis de fragmento automatizado, siendo marcados con diferentes etiquetas fluorescentes, lo cual a su vez incrementa la precisión en la estimación del peso molecular de los alelos, así como la eficiencia en el análisis, por medio de la PCR múltiple (Contreras, 2011).

Análisis de Fragmentos de Microsatélites

El análisis de fragmentos consiste en la evaluación de cualquier molécula de ADN, la cual es separada con base en su movilidad, tiene un rango amplio de aplicaciones, entre las que se encuentra el análisis de *loci* de microsatélites amplificados por PCR, mediante inyección

electrocinética de muestras y electroforesis capilar, que se puede realizar en un secuenciador de fragmentos (Life technologies, 2010).

Una vez finalizada la corrida de electroforesis, se realiza el análisis de SSR con algún software específico, como el GeneMapper®, Peak scanner®, Genescan®, Genotyper®, con la finalidad de identificar los alelos presentes en las muestras (Contreras, 2011). El análisis de fragmentos para microsatélites se lleva a cabo en la región de interés, la cual se amplifica con iniciadores marcados en el extremo 5', analizados mediante electroforesis capilar, los fragmentos se resuelven con base en su peso molecular a medida que van migrando a través de un polímero; se utiliza un marcador de peso molecular interno (*Size Standard*), cargado con cada muestra, que co-migra con las muestras de interés bajo las mismas condiciones de electroforesis. El software de análisis genera una curva de tamaño específico, la cual se basa en el tamaño de los fragmentos conocidos del *Size Standard* y así los tamaños de los fragmentos desconocidos son determinados (Life technologies, 2010).

El software GeneMapper v 4.0 es una solución automatizada para el análisis de microsatélites, SNAaPshot®, SNPlex, LOH, AFLPs y otras aplicaciones de genotipificación. El software hace un control de calidad PQV (Process Quality Value) que ayuda en el análisis de datos, encontrando y solucionando problemas en la preparación y análisis (Life technologies, 2010).

Electroforesis capilar

En biología molecular la mayoría de los estudios básicos y aplicados requieren el uso de la electroforesis; sin embargo, este procedimiento presenta variaciones de acuerdo con el tipo de estudio a ejecutar. Existen diferentes tipos de electroforesis, las más utilizadas son las de tipo vertical, que se analizan tanto moléculas de ADN como proteínas, mientras que en la electroforesis horizontal generalmente se trabaja con ADN o ARN (Yábar, 2003).

La electroforesis capilar es una técnica de separación utilizada en distintas áreas (química, bioquímica, biología molecular, etc.) para separar las diferentes moléculas presentes en una

disolución de acuerdo con la relación masa/carga de las mismas. La separación se lleva a cabo en un tubo hueco de diámetro muy pequeño, de ahí que reciba el nombre de capilar. Dentro de este capilar se encuentran la disolución que contiene los análisis o las moléculas (ácidos nucleicos) a separar y el tampón o medio electrolítico (polímero) que es el encargado de conducir la corriente (Castagnino, 1999).

El fundamento de la electroforesis capilar radica en separar una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta que son colocadas en un campo eléctrico en donde es necesario aplicar una diferencia de potencial entre los dos extremos del capilar que hará que las moléculas se muevan hacia un extremo u otro del capilar (movilidad electroforética), las moléculas catiónicas hacia el polo negativo y las aniónicas hacia el polo positivo, y que se vayan separando entre sí. Existe dentro del capilar otro fenómeno denominado flujo electroosmótico que se da debido a que la superficie interna del capilar está cargada. El flujo electroosmótico es el mismo dentro de todo el capilar y afecta de igual forma a todas las moléculas arrastrándolas hacia uno de los extremos; así, la separación se verá afectada por el flujo electroosmótico y por la movilidad electroforética de cada una de las moléculas. Las moléculas, en el caso de los ácidos nucleicos están cargadas negativamente y al someterlas a un campo eléctrico migran hacia el polo positivo de este a través de un gel o capilar (Castagnino, 1999).

La eficacia y la velocidad de la separación se pueden mejorar mediante la optimización de diferentes factores como son la temperatura, el voltaje aplicado, el medio de separación, el disolvente en el que se encuentra disuelta la muestra, etc. Generalmente, se obtienen tiempos de análisis bastante bajos si se compara con otras técnicas separativas como la cromatografía de gases, de líquidos o electroforesis con agarosa o poliacrilamida. El consumo de muestra y reactivos es muchísimo menor que con otras técnicas de separación, es muy versátil, ya que se puede emplear para separar cualquier tipo de compuesto eligiendo bien el detector y se puede acoplar a un detector UV, de fluorescencia, un espectrómetro de masas, etc. (Castagnino, 1999).

4.2.4. SSR empleados en estudios de la diversidad del maíz

Durante la última década, numerosos estudios se han realizado en maíz al comparar las estimaciones de divergencia genética, diversidad genética y discriminación entre individuos, por medio de polimorfismos de marcadores, de proteínas, o ADN. Stuber y Goodman (1983) mostraron que la variación de isoenzimas podría proporcionar una estimación precisa de la distancia genética, en consonancia con pedigrí conocida, en 31 líneas de maíz. Lee *et al.* (1989) y Melchinger *et al.* (1990) informaron que los patrones de variabilidad en RFLPs arrojaron medidas de distancia genética que eran compatibles con el pedigrí conocido y eran útiles para la asignación de líneas de maíz a grupos heteróticos.

En maíz los estudios con SSR pueden presentar algunas diferencias cuando se comparan entre ellos, especialmente en el número de alelos reportados y en la heterocigosidad esperada, debido a la naturaleza dinucleótida, trinucleótida, etc. de los SSR seleccionados (Vigouroux *et al.*, 2008; Reif *et al.*, 2006), así como al tamaño de muestra, las accesiones seleccionadas y los individuos seleccionados para representar cada accesión (Reif *et al.*, 2006).

El empleo de marcadores moleculares ha permitido conformar las clasificaciones en maíz, los agrupamientos que se conocen como complejos raciales con una distribución regional con frecuencia acordes a los diferentes grupos étnicos que los cultivan (Pressoir y Berthaud, 2004), permitiendo elaborar una clasificación por adaptación agroecológica, características de la mazorca, características útiles, de grano y usos (Ortega, 2003), lo cual ha ayudado en el entendimiento de la diversidad genética dentro y entre razas y poblaciones.

5. LITERATURA CITADA

- Agarwal M, N Shrivastava, H Padh (2008)** Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* 27: 617-631.
- Anderson E, H C Cutler (1942)** Races of *Zea mays*: I. Their recognition and classification. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 29: 69-88.
- Arnason J T, B Baum, J Gale, J D H Lambert, D Bergvinson, B J R Philogene, J A Serratos, J Mihm, D C Jewell (1994)** Variation in resistance of Mexican landraces of maize to maize weevil *Sitophilus zeamais*, in relation to taxonomic and biochemical parameters. *Euphytica* 74: 227-236.
- Azofeita-Delgado A (2006)** Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Revisión bibliográfica. *Agronomía Mesoamericana* 17: 221-242.
- Balbás P (2002)** De la Biología Molecular a la Biotecnología. Editorial Trillas. México, D. F. 324 p.
- Becher S A, K Steinmetz, K Weising, S Boury, D Peltier, J P Renou, G Kahl, K Wolff (2000)** Microsatellites for cultivar identification in *Pelargonium*. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 643-651.
- Bedoya S C, C Mir, A Charcosset, M Warburton (2010)** Migración del maíz a partir de su centro de origen; evidencias históricas, genéticas y paleobotánicas. *In: El Cultivo del Maíz, Temas Selectos*. Rodríguez M R, C de León (eds.). Volumen 2. Ed. Mundi Prensa, México. 227 p.
- Bellon M R, J Risopoulos (2001)** Small-scale farmers expand the benefits of improved maize germplasm: a case study from Chiapas, Mexico. *World Development* 29: 799-811.
- Benz B F (1986)** Taxonomy and evolution of Mexican Maize. Ph D. Dissertation. University of Wisconsin. Madison, Wisconsin, U.S.A. 433 p.
- Berumen C J (1993)** El análisis del ácido desoxirribonucleico -DNA- en la identificación de individuos. *Ciencia y Desarrollo* 111: 34-42.
- Brieger F G, J T A Gurgel, E Paterniani, A Blumenschein, M R Alleoni (1958)** Races of Maize in Brazil and other Eastern South American Countries. Publication 593. National Academy of Sciences-National Research Council. Washington, D.C., U.S.A. 283 p.
- Brown W L, M M Goodman (1977)** Races of corn. *In: Corn and Corn Improvement*. Sprague

- G F (ed.). Number 18. Series Agronomy. American Society of Agronomy. Publisher, Madison, Wisconsin, U.S.A. pp: 49-88.
- Castagnino J M (1999)** Electroforesis capilar. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana XXXIII: 297-329.
- Castillo G F (1993)** La variabilidad genética y el mejoramiento genético de los cultivos. Ciencia 44: 69-79.
- Castillo G F (2011)** Reseña de Nuevo Libro. Amplitud, Mejoramiento, Usos y Riesgos de la Diversidad Genética de Maíz en México. *In: Amplitud, Mejoramiento, Usos y Riesgos de la Diversidad Genética de Maíz en México.* Preciado O R E, S Montes H (eds.). Revista Fitotecnia Mexicana 34: 2-4.
- Cervantes S T, M M Goodman, E Casas D, J O Rawlings (1978)** Use of genetic effects and genotype by environmental interactions for the classification of Mexican races of maize. Genetics 90: 339-348.
- Chávez E (1913)** El cultivo del maíz. Boletín 74. Estación Agrícola Central. Secretaría de Fomento. Dirección General de Agricultura. México, D. F. 316 p.
- Chippindale P T, J J Wiens (1994)** Weighting, partitioning, and combining characters in phylogenetic analysis. Systematic Biology 43: 278-287.
- Classen D, J T Arnason, J A Serratos, J D H Lambert, C Nozzolillo, B J R Philogene (1990)** Correlation of phenolic acid content of maize to resistance to *Sitophilus zeamais*, the maize weevil, in CIMMYT's collections. Journal of Chemical Ecology 16: 301-315.
- Contreras T A R (2011)** Análisis de la diversidad genética de variedades nativas de Chile "poblano" por medio de microsatélites. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 70 p.
- Doebley J F, M M Goodman, C W Stuber (1985)** Isozyme variation in the races of maize from Mexico. American Journal of Botany 72: 629-639.
- FAOSTAT de Estadísticas de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) (2014)** Datos finales correspondientes al año 2012. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567# an cor> (Consultado Mayo, 2014).
- Ford-Lloyd B, M Jackson (1986)** Plant Genetic Resources. An Introduction to their Conservation and Use. Edward Arnold. London. 152 p.

- González L, A Hernández, J Alezones (2009)** Caracterización molecular de líneas tropicales de maíz (*Zea mays* L.) y su relación con los patrones heteróticos. *Bioagro* 21: 165-172.
- González C M M, J Simpson (1991)** Uso de marcadores genéticos moleculares (RFLPs) en la agricultura. Capítulo 12. *In: Introducción a la Biología Molecular e Ingeniería Genética de Plantas*. Rivera B R, I Torres P, J A Garzón T, L Herrera E (eds.). SAGARPA-INIFAP-CINVESTAV. Celaya, Gto. México. pp: 204-222.
- Goodman M M (1972)** Distance analysis in biology. *Systematic Biology* 21: 174-186.
- Goodman M M, R M Bird (1977)** The races of maize IV: tentative grouping of 219 Latin American races. *Economic Botany* 31: 204-221.
- Goodman M M, W L Brown (1988)** Races of corn. *In: Corn and Corn Improvement*. 3rd. ed. Sprague G F, J W Dudley (eds.). Agronomy Monograph 18. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin, U.S.A. pp: 33-79.
- Hernández C J M (1986)** Estudio de caracteres químicos del grano de las razas mexicanas de maíz y clasificación racial. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo Edo. de México. 79 p.
- Hernández P (2005)** Comparison among available marker systems for cereal introgression breeding: a practical perspective. *Euphytica* 146: 95-100.
- Hernández X E, G Alanís F (1970)** Estudio morfológico de cinco nuevas razas de maíz de la Sierra Madre Occidental de México. Implicaciones filogenéticas y fitogeográficas. *Agrociencia* 5: 3-30.
- Herrera-Cabrera B E, F Castillo-González, J J Sánchez-González, J M Hernández-Casillas, R Ortega-Pazkca, M M Goodman (2004)** Diversidad de maíz Chalqueño. *Agrociencia* 38: 191-206.
- Hidalgo R (2003)** Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. *In: Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos*. Franco L T, R Hidalgo (eds.) Boletín técnico No. 8. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Cali, Colombia. 89 p.
- Junjian N, M Peter-Colowit, D J Mackill (2002)** Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellites markers. *Crop Science* 42: 601-607.

- Kato Y T A (1984)** Chromosome morphology and the origin of maize and its races. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 219-253.
- Kato Y T A (1988)** Cytological classification of maize race populations and its potential use. *In: Recent Advances in the Conservation and Utilization of Genetic Resources. Proceeding of the Global Maize Germplasm Workshop.* Russel N, G M Listman (eds.). CIMMYT. México, D. F. pp: 106-117.
- Kato Y T A, C Mapes S, L M Mera O, J A Serratos H, R A Bye B (2009)** Origen y Diversificación del Maíz. Una Revisión Analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D. F. 115 p.
- Khush G (2001)** Green revolution the way forward. *Nature Reviews Genetics* 2: 815-822.
- Kluge A G, A J Wolf (1993)** Cladistics: what's in a word? *Cladistics* 9: 183-199.
- LAMP (Proyecto Latinoamericano de Maíz) (1991)** Catálogo del germoplasma de maíz sl. Tomo 2. ARS-USDA, CIMMYT, Pioneer Hi-Bred International Inc., Universidad Agraria La Molina (Perú) 1052 p.
- Lee M, E B Godshalk, K R Lamkey, W W Woodman (1989)** Association of restriction fragment length polymorphisms among maize inbreds with agronomic performance of their crosses. *Crop Science* 29: 1067-1071.
- Life technologies (2010)** Curso de Análisis de Fragmentos en el equipo 3130. FAS Manual Fragmentos 3130 vol 1.1. México, D. F. 35 p.
- López-Santiago J, R Nieto-Ángel, A F Barrientos-Priego, E Rodríguez-Pérez, M T Colinas-León, M W Borys, F González-Andrés (2008)** Selección de variables morfológicas para la caracterización del tejocote (*Crataegus* spp.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14: 97-111.
- Llorente-Bousquets J, S Ocegueda (2008)** Estado del conocimiento de la biota. *In: Capital Natural de México. Vol. I: Conocimiento Actual de la Biodiversidad.* Soberón, J G Halftter, J Llorente-Bousquets (comps.). CONABIO. México, D. F. pp: 83-322.
- Maya S F, J L Olivares-Carrillo, L I Flores-Crespo, V Rivera-Aguilar (2005)** Estudio citogenético del maíz híbrido simple H-311 (*Zea mays* L. ssp. *mays*), teocintle Chalqueño (*Zea mays* L. ssp. *mexicana*) y su híbrido F1 (*Zea mays* L. ssp. *mays* × *Zea mays* L. ssp. *mexicana*). *Polibotanica* 20: 47-72.

- Matsuoka Y, Y Vigouroux, M M Goodman, J Sánchez G, 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.
- McClintock B, T A Kato Y, A Blumenschein (1981)** Chromosome Constitution of Races of Maize. Its Significance in the Interpretation of Relationships between Races and Varieties in the Americas. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. 517 p.
- Melchinger A E, M Lee, K R Lamkey, A R Hallauer, W L Woodman (1990)** Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms and heterosis for two diallel sets of maize inbreds. *Theoretical and Applied Genetics* 80: 488-496.
- Mijangos-Cortés J O, T Corona-Torres, D Espinosa-Victoria, A Muñoz-Orozco, J Romero-Peñaloza, A Santacruz-Varela (2007)** Differentiation among maize (*Zea mays* L.) landraces from the Tarasca Mountain Chain, Michoacan, Mexico and the *Chalqueño* complex. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 309-325.
- Montalvo H L (1998)** Caracterización molecular y morfológica de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 111 p.
- Moritz C, D M Hillis (1996)** Molecular systematics: context and controversies. *In: Molecular Systematics*, 2da ed. D M Hillis, C Moritz, B K Mable (eds.). Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. pp: 1-13.
- Muñoz O A (2003)** Centli Maíz. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 211 p.
- Nuez V F, J M Carrillo B (2000)** Los Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 581 p.
- Ortega P R (1973)** Variación en maíz y cambios socioeconómicos en Chiapas, México. 1946-1971. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Chapingo, Edo. de México. 199 p.
- Ortega P R (1985)** Variedades y razas mexicanas de maíz y su evaluación en cruzamientos con líneas de clima templado como material de partida para fitomejoramiento. Traducción resumida de Tesis de Ph. D. Instituto Nacional de Plantas de la Unión Soviética “N. I. Vavilov”. Leningrado, URSS. 22 p.
- Ortega P R (2003)** La diversidad del maíz en México. *In: Sin Maíz no Hay País*. Esteva G, C

- Marielle (coords.). Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, Dirección General de Culturas Populares e Indígenas. México, D. F. pp: 123-154.
- Ortega P R A, J J Sánchez G, F Castillo G, J M Hernández C (1991)** Estado actual de los estudios sobre maíces nativos de México. *In: Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos de México.* Ortega P R, G Palomino H, F Castillo G, V A González H, M Livera M (eds.). Sociedad Mexicana de Fitogenética, A. C., Chapingo, Edo. de México. pp: 161-185.
- Patterson C, D M Williams, C J Humphries (1993)** Congruence between molecular and morphological phylogenies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 153-188.
- Picca A, M Helguera, N Salomón, A Carrera (2004)** Marcadores moleculares. *In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Parte I. Biotecnología y Agricultura.* Echenique V, C Rubinstein, L Mroginski (eds.). Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. pp: 61-68.
- Pressoir G, J Berthaud (2004)** Population structure and strong divergent selection shape phenotypic diversification in maize landraces. *Heredity* 92: 95-101.
- Reid L M, J T Arnason, C Nozzolillo, R I Hamilton (1991)** Laboratory and field resistance to the European corn borer in maize germplasm. *Crop Science* 31: 1496-1502.
- Reif J C, M L Warburton, X C Xia, D A Hoisington, J Crossa, S Taba, J Muminović, M Bohn, M Frisch, A E Melchinger (2006)** Grouping of accessions of Mexican races of maize revisited with SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 177-185.
- Ron P J, J J Sánchez G, A A Jiménez C, J A Carrera V, J G Martín L, M M Morales R, L de la Cruz L, S A Hurtado de la P, S Mena M, J G Rodríguez F (2006)** Maíces nativos del Occidente de México I. *Colectas 2004. Scientia-CUCBA* 8: 1-139.
- Salgado A (2011)** Diversidad, erosión y contaminación genética de maíz nativo en México. *In: Biodiversidad, Erosión y Contaminación Genética del Maíz Nativo en América* Manzur M I (ed.). Fundación Heinrich Böll y de Broedelij Denlen. pp: 13-33.
- Sánchez G J J (1989)** Relationships among the Mexican races of maize. Ph. D. Dissertation. North Carolina State University. Raleigh, North Carolina, U.S.A. 187p.
- Sánchez, G J J, M M Goodman, C W Stuber (2000)** Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Economic Botany* 54: 43-59.

- Santacruz-Varela A, M P Widrlechner, K E Ziegler, R J Salvador, M J Millard, P K Betting (2004)** Phylogenetic relationships among North American Popcorns and the evolutionary links to Mexican and South American popcorns. *Crop Science* 44: 1456-1467.
- Sharma L, B M Prasanna, B Ramesh (2010)** Analysis of phenotypic and microsatellite-based diversity of maize landraces in India, especially from the North East Himalayan region. *Genetica* 138: 619-631.
- Stuber C W, M M Goodman (1983)** Allozyme genotypes for popular and historically important inbred lines of corn, *Zea mays* L. Agricultural Research Results No. 16. Agricultural Research Service, USDA. New Orleans, LA. 29 p.
- Sturtevant E L (1899)** Varieties of corn. United States Department of Agriculture Office of Experiment Stations Bulletin 57: 1-108.
- Tingey S V, J P del Tufo (1993)** Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiology* 101: 349-352.
- Valadez M E, G Kahl (2005)** Huellas de ADN en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Mundi-Prensa. México, D. F. 147 p.
- Vavilov N I (1951)** Origin, Variation, Immunity and Breeding of Cultivated Plants. *Chronica Botanica*. Vol. 13. Waltham, MA. 366 p.
- Vélez G, M García (2011)** Diversidad, erosión y contaminación genética de maíz nativo en Colombia. *In: Biodiversidad, Erosión y Contaminación Genética del Maíz Nativo en América* Manzur M I (ed.). Fundación Heinrich Böll y de Broedelij Denlen. pp: 49-92.
- Vigouroux Y, J C Glaubitz, Y Matsuoka, M M Goodman, J Sánchez G, J Doebley (2008)** Population structure and genetic diversity of new world maize races assessed by DNA microsatellites. *American Journal of Botany* 95: 1240-1253.
- Warburton M, X Xianchun, J Crossa, J Franco, A Melchinger, M Frisch, M Bohn, D Hoisington (2002)** Genetic characterization of Cimmyt inbred maize lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods. *Crop Science* 42: 1832-1840.
- Weaver M P (1981)** The Aztecs, Maya, and their Predecessors. *Archaeology of Mesoamerica*. 2nd ed. Academic Press. New York, U.S.A. 597 p.
- Wellhausen E J, L M Roberts, E Hernández X (en colaboración con 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. 236 p.

Wen W, J Franco, V H Chavez-Tovar, J Yan, S Taba (2012) Genetic characterization of a core set of a tropical maize race Tuxpeño for further use in maize improvement. *In: PLoS ONE 7(3): e32626.doi:10.1371/journal.pone.0032626.*

Yábar V C A (2003) Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Serie de Normas Técnicas N° 38. Instituto Nacional de Salud. Ministerio Nacional de Salud. Lima, Perú. 59 p.

Zerjal T, A Rousselet, C Mhiri, V Combes, D Madur, M A Grandbastien, A Charcosset, M I Tenailon (2012) Maize genetic diversity and association mapping using transposable element insertion polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics 124: 1521-1537.*

CAPÍTULO I

DIVERSIDAD GENÉTICA EN ACCESIONES TIPO DE DIEZ RAZAS MEXICANAS DE MAÍZ DE ALTITUDES INTERMEDIAS

1. RESUMEN

La diversidad del maíz (*Zea mays* L.) en México es tan amplia, que a pesar de los estudios realizados para su entendimiento, aún existe la necesidad de llevar a cabo trabajos que permitan discernir la variación dentro y entre los diferentes grupos raciales, así como establecer una colección de referencia racial. En esta investigación se valoró la diversidad morfológica de poblaciones representativas de 10 razas de México. En el ciclo primavera-verano del 2010 se establecieron experimentos con 88 accesiones representativas de las razas Bofo, Celaya, Coscomatepec, Dulce, Elotes Occidentales, Mushito, Palomero de Jalisco, Serrano de Jalisco, Tablilla de Ocho, y Zamorano Amarillo, en las localidades de Roque, Guanajuato y Ciudad Guzmán, Jalisco, bajo un diseño experimental de bloques incompletos, en los que se midieron 30 caracteres morfológicos. El análisis de varianza indicó diferencias significativas entre las accesiones para todos los caracteres (variables). El análisis de repetibilidad reflejó que 16 caracteres presentaron un coeficiente ≥ 3.0 , éstos fueron los menos afectados por el ambiente, mismos que se usaron en los análisis posteriores. En el análisis de componentes principales y conglomerados se observó variación dentro y entre razas, con una dispersión continua, pero que permitió identificar cuatro complejos raciales. El Grupo I lo integraron accesiones principalmente de Bofo, el II de Celaya, el III de Dulce y el IV de Elotes Occidentales; las razas restantes se agregan en su mayoría en el Grupo II como subgrupos. Con el apoyo de análisis discriminante se proponen accesiones de estas razas para establecer una colección de referencia racial. Este estudio confirmó agrupamientos de accesiones en razas bien definidas y representadas en los bancos de germoplasma. Es necesario realizar estudios más profundos en razas con pocas accesiones para lograr una mejor definición racial.

Palabras clave: *Zea mays* L., caracteres morfológicos, taxonomía numérica, análisis multivariado, grupos raciales, colección de referencia racial.

GENETIC DIVERSITY IN TYPICAL ACCESSIONS OF TEN MEXICAN MAIZE RACES OF ALTITUDES INTERMEDIATE

2. SUMMARY

The diversity of maize (*Zea mays* L.) in Mexico is so wide that despite numerous studies, there still the need to carry out research to discern the variation within and among different racial groups, as well as to establish a racial reference collection. In this research, the morphological diversity of representative populations of 10 Mexican races was evaluated. In the spring-summer season of 2010 two experiments with 88 representative accessions of Bofo, Celaya, Coscomatepec, Dulce, Elotes Occidentales, Mushito, Palomero de Jalisco, Serrano de Jalisco, Tablilla de Ocho, and Zamorano Amarillo were established in the localities of Roque, Guanajuato and Ciudad Guzman, Jalisco, under an incomplete block experimental design, in which 30 morphological characters were measured. The analysis of variance (ANOVA) showed significant differences among accessions for all characters. The repeatability analysis illustrated that 16 characters had a coefficient value ≥ 3.0 , corresponding to those least affected by the environment, which then were used in subsequent analyzes. The cluster and principal component analysis showed variation within and among races, with a continuous dispersal, but allowed the identification of four racial complexes. Group I integrates mainly Bofo accessions, Group II Celaya, Group III Dulce and Group IV Elotes Occidentales. The remaining races were confined mostly in Group II as subgroups. With the support of discriminant analysis accessions of these races are proposed to establish a collection of racial reference. This study confirmed clusters of accessions in well-defined races with sufficient accessions in gene banks. Further and more profound analysis on races with few accessions are needed in order to achieve a clear racial description.

Index words: *Zea mays* L., morphological characters, numerical taxonomy, multivariate analysis, racial groups, racial reference collection.

3. INTRODUCCIÓN

México es reconocido como centro de origen y domesticación del maíz, por lo que existe gran diversidad de tipos que han sido adaptados a condiciones ambientales y socioculturales específicas (Matsuoka *et al.*, 2002). En México la variabilidad genética de maíz es el resultado de la interacción humana durante miles de años con los parientes silvestres y el medio ambiente (CONABIO, 2013). En ese proceso se dan los mecanismos de dispersión, la recombinación genética por cruza naturales entre maíz y teocintle (*Zea mays* ssp. *huehuetenanguensis*, ssp. *mexicana* y ssp. *parviglumis*, entre otras), a través de la geografía del país y la amplia diversidad de grupos humanos, quienes realizan selección de acuerdo a sus costumbres en nichos ecológicos específicos (Muñoz, 2003).

Para entender la diversificación genética, se ha estudiado la diferenciación morfológica entre las poblaciones nativas de maíz aplicando el concepto de raza. Se ha utilizado a los caracteres fisiológicos y morfológicos reproductivos, principalmente, como una herramienta para valorar la diversidad (Anderson y Cutler, 1942; Wellhausen *et al.*, 1951; Goodman y Paterniani, 1969; Hernández y Alanís, 1970). Para lograr una valoración racial acertada, es necesario conocer también de la mejor manera la variación existente entre variantes dentro de las razas (Castillo, 1993), con el propósito de diseñar el aprovechamiento de algunas formas dentro de la diversidad genética regional de la especie.

A la fecha se han descrito aproximadamente 62 razas de maíz, número que se incrementa o disminuye ligeramente según las consideraciones de cada estudio (Wellhausen *et al.*, 1951; Hernández y Alanís, 1970; Sánchez y Goodman, 1992; Sánchez *et al.*, 2000). Muchas de las poblaciones nativas de maíz recolectadas en México son variantes intermedias entre razas; sin embargo, una vez conocidas las características de las variantes descritas como representativas de razas se pueden proponer posibles rutas de diversificación racial (Wellhausen *et al.*, 1951).

Los estudios de la diversidad del maíz en México han incluido escasas muestras representativas de las razas descritas (Wellhausen *et al.*, 1951), o bien se han concentrado en la diversidad en áreas geográficas específicas (Herrera-Cabrera *et al.*, 2004; Mijangos-Cortés *et al.*,

2007). El conocimiento de la diversidad genética es indispensable para ampliar las fuentes de germoplasma, tratar de minimizar los riesgos de vulnerabilidad genética, incrementar las probabilidades de detectar alelos favorables y conservar los recursos fitogenéticos (Bellon *et al.*, 2009).

Las aportaciones de los estudios de Wellhausen *et al.* (1951), Hernández y Alanís (1970), Sánchez y Goodman (1992), Sánchez *et al.* (2000) y Ortega *et al.* (1991), entre otros, en razas como Bofo, Celaya, Coscomatepec, Dulce, Elotes Occidentales, Mushito, Palomero de Jalisco, Serrano de Jalisco, Tablilla de Ocho y Zamorano Amarillo indican que la diversidad del maíz ha sido estudiada paso a paso para reunir la variabilidad genética racial existente, en forma intensiva en diferentes regiones ecológicas y étnicas del país, así como por sus formas especializadas de consumo, y han sentado la base para las clasificaciones raciales actuales por medio de caracteres morfológicos, fisiológicos, genéticos, bioquímicos y moleculares; sin embargo, las caracterizaciones raciales de algunas accesiones, en los bancos de germoplasma han sido identificadas y clasificadas en colecciones que figuran como típicas y no corresponden con las descripciones raciales propuestas por estos autores.

En este contexto el presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la diversidad genética de accesiones representativas de diez razas de maíz con adaptación a altitudes intermedias (1400-1800 msnm) mediante caracteres morfológicos para estimar la diversidad genética entre y dentro de razas, que permita clasificarlas por sus características intrínsecas y proponer accesiones tipo para integrar una colección de referencia racial para los bancos de germoplasma nacionales.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material genético

Se caracterizaron 88 accesiones de maíz, catalogadas de acuerdo con sus datos de pasaporte como pertenecientes a 10 razas de México: Bofo (8 accesiones), Celaya (15), Coscomatepec (7), Dulce (12), Elotes Occidentales (23), Mushito (5), Palomero de Jalisco (1), Serrano de Jalisco (3), Tablilla de Ocho (7) y Zamorano Amarillo (7). La semilla fue

proporcionada por los bancos de germoplasma del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, de la Universidad Autónoma Chapingo, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias y del Colegio de Postgraduados.

4.2. Sitios experimentales y ciclos de cultivo

Se establecieron dos experimentos en el ciclo primavera-verano 2010, el primero de ellos en el Campo Experimental del Instituto Tecnológico de Roque, Celaya, Guanajuato (20°34'55" LN, 100°49'33" LO, altitud de 1766 msnm) y el segundo en el Rancho los Paredones, Cd. Guzmán, Jalisco (19°43'09" LN, 103°29'57" LO, altitud de 1515 msnm), ambos manejados bajo un régimen de riego.

4.3. Diseño y unidad experimental

Los experimentos se establecieron bajo un diseño experimental en bloques incompletos 9 x 10, con dos repeticiones incluyendo las 88 accesiones bajo estudio y como referencia dos materiales mejorados recomendados en cada localidad. La unidad experimental consistió de dos surcos de 5 m de longitud y 0.85 m de ancho. Se sembraron tres semillas por mata a 0.50 m de separación; seis semanas después de la siembra se aclareo para dejar dos plantas por mata para una densidad de población de 47,000 plantas ha⁻¹.

4.4. Caracteres medidos

De cada parcela se etiquetaron al azar cinco plantas con competencia completa, en las que se midieron 30 variables, mediante los procedimientos indicados por Sánchez *et al.* (1993).

Caracteres vegetativos y fenológicos: en la etapa final del desarrollo vegetativo (cuando esta expandida la última hoja en el ápice de la planta), se midió en cm la altura de planta (AP), altura a la mazorca (AMz), longitud de la hoja de la mazorca (LHMz) y ancho de la hoja de la mazorca (AHMz), número de hojas totales (HojP), hojas arriba de la mazorca (HAMz) y de hijuelos por planta (HijP). En la etapa de floración se registraron los días a floración femenina

(FF) y masculina (FM), en días después de la siembra; la primera cuando el 50% de las plantas de la unidad experimental presentaba estigmas expuestos y la segunda cuando el 50% de las plantas presentaban emisión de polen; además se estimó sincronía floral (SF, FF-FM) y la relación AMz/AP.

Caracteres de la espiga: una semana después de la antesis se midió en cm la longitud total de la espiga (LE), del pedúnculo (LPE), de la rama central (LRCE, eje central a partir del punto de inserción de la rama lateral más alta), y del tramo ramificado (LTRE), así como el número de ramas primarias (RPE), y la relación LTRE/LE.

Caracteres de la mazorca: se midió en cm la longitud (LMz), diámetro (DMz, en el centro de la mazorca), longitud del pedúnculo (LPMz), diámetro de olote (DO), y número de hileras (HMz); también se estimó la relación LMz/DMz.

Caracteres de grano: las mazorcas se desgranaron en forma individual y de la parte central se tomó una muestra de 10 granos por mazorca para medir en mm el ancho (AGr), longitud (LGr) espesor (EGr) y relación AGr/LGr; se tomó otra muestra de 100 granos, para medir el peso (P100Gr, g), volumen (V100Gr, cm³) y el coeficiente de desgrane en porcentaje (CD = [(peso del grano) x (100)/peso total de la mazorca]).

4.5. Análisis estadístico

Se aplicó un análisis de varianza a través de localidades. Se estimaron los componentes de varianza para genotipos (σ^2_{gen}), localidades (σ^2_{loc}) y su interacción ($\sigma^2_{\text{gen} \times \text{loc}}$), y con ellos se estimó el coeficiente de repetibilidad $r = [\sigma^2_{\text{gen}} / (\sigma^2_{\text{loc}} + \sigma^2_{\text{gen} \times \text{loc}})]$, el cual se utilizó para realizar una selección de variables, tomando como criterio aceptar los caracteres con $r \geq 3.0$ (Goodman y Paterniani, 1969). Las variables seleccionadas fueron utilizadas para realizar los análisis que a continuación se describen.

Se aplicó un análisis de componentes principales con base en la matriz de correlaciones, se graficó la dispersión de las accesiones en el plano determinado por los dos primeros

componentes, mediante biplot descrito por Sánchez (1995), y un análisis de conglomerados utilizando el coeficiente de distancia euclidianas y el método de agrupamiento de la media aritmética no ponderada (UPGMA). Adicionalmente, se aplicó un análisis discriminante para construir un modelo predictivo de la pertenencia racial de las accesiones a un grupo o raza, sobre la base de las características observadas en cada accesión. Para ello se estableció una función discriminante que considera la medida de la distancia cuadrática generalizada basada en la matriz de varianzas y covarianzas (Rao, 2002). Cada accesión fue ubicada en el grupo hacia el cual ésta tenía la menor distancia cuadrática generalizada (Com. pers.¹); la definición de las accesiones para la integración de una Colección de Referencia Racial (CRR) para cada raza se realizó con una probabilidad obtenida en el análisis discriminante mayor a 80% (Sinobas y Díaz, 1999). Se utilizaron los paquetes estadísticos Statistical Analysis System (SAS) versión 9.3 para Windows (SAS Institute, 2002) y NTSYSpc versión 2.21 h (Rohlf, 2009).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Análisis de varianza

Con el análisis de varianza combinado de los 88 genotipos a través de localidades se detectaron diferencias estadísticas significativas en la totalidad de las variables evaluadas, lo que indica la presencia de amplia diversidad genética entre las accesiones de las 10 razas de maíz estudiadas (Cuadro 1.1). Estos resultados concuerdan con los reportados por Herrera *et al.* (2000), Hortelano *et al.* (2008) y Chavéz-Servia *et al.* (2011) quienes señalan que las diferencias estadísticas entre maíces nativos es un indicador de diversidad genética en ellos para el carácter bajo análisis. En la interacción genotipos por localidades, 70% del total de las variables fueron estadísticamente significativas, indicativo de que al menos una de las accesiones presentó una respuesta diferencial en los caracteres al cambiar de localidad.

¹ Santacruz-Varela A (2001) Genetic diversity of North America popcorn and its relationships with Mexican and South American popcorns. Ph. D. Dissertation. Iowa State University, Ames, IA.

Cuadro 1.1. Cuadrados medios del análisis de varianza combinado a través de localidades, para 30 caracteres morfológicos. Roque, Celaya, Gto. y Los Paredones, Cd. Guzmán, Jal., México. 2010.

Variable	Fuente de Variación					Media	C.V. (%)
	Loc	Rep/Loc	Gen	Gen x Loc	Error		
	gl	1	2	89	89		
FF	2992.90**	253.25**	642.86**	67.26*	49.26	83.61	8.0
FM	1886.04**	396.01**	665.69**	71.27*	52.07	82.33	9.0
SF	513.61**	8.62 ^{NS}	8.03**	6.48**	3.20	5.08	35.0
HijP	0.53*	0.05 ^{NS}	0.30**	0.17*	0.12	0.44	80.0
AP	25959.30**	579.00 ^{NS}	10527.57**	1041.71**	389.92	245.95	8.0
AMz	88304.13**	204.75 ^{NS}	8360.16**	922.63**	280.96	146.38	11.0
AMz/AP	0.59**	0.00 ^{NS}	0.01**	0.00 ^{NS}	0.00	0.58	7.0
HojP	235.38**	10.13**	15.62**	1.70**	0.96	13.87	7.0
HojAMz	72.63**	0.36 ^{NS}	1.27**	0.26**	0.16	5.34	8.0
LHMz	7758.08**	114.25 ^{NS}	484.15**	57.41 ^{NS}	51.66	95.57	8.0
AHMz	0.09 ^{NS}	1.74*	4.11**	0.86**	0.54	8.50	9.0
LE	246.18**	14.41 ^{NS}	70.70**	22.36 ^{NS}	17.35	43.60	10.0
LTRE	711.07**	1.19 ^{NS}	29.72**	7.92**	5.12	14.48	16.0
LTRE/LE	0.23**	0.00 ^{NS}	0.01**	0.00**	0.00	0.33	18.0
LPE	24.08 ^{NS}	11.56 ^{NS}	30.66**	11.87 ^{NS}	10.89	25.71	13.0
LRCE	130.30**	8.99 ^{NS}	40.98**	21.47 ^{NS}	16.62	29.37	14.0
RPE	409.17**	1.24 ^{NS}	40.49**	12.01 ^{NS}	9.07	15.46	19.0
LMz	38.12**	1.23 ^{NS}	24.49**	3.54**	1.84	18.32	7.0
DMz	0.53*	0.01 ^{NS}	0.61**	0.11*	0.08	4.56	6.0
LMZ/DMz	0.15 ^{NS}	0.01 ^{NS}	1.35**	0.34*	0.25	4.07	12.0
HMz	53.38**	0.31 ^{NS}	17.04**	2.02**	0.99	12.36	8.0
LPMz	2220.95**	19.93 ^{NS}	37.72**	16.57**	9.77	14.42	22.0
DO	0.00 ^{NS}	0.00 ^{NS}	0.30**	0.06*	0.04	2.42	9.0
LGr	15.57**	0.25 ^{NS}	4.92**	0.73 ^{NS}	0.62	12.55	6.0
AGr	11.26**	0.25 ^{NS}	7.81**	0.55*	0.36	9.74	6.0
AGr/LGr	0.21**	0.00 ^{NS}	0.05**	0.00 ^{NS}	0.00	0.78	11.0
EGr	4.01**	0.18 ^{NS}	1.02**	0.22*	0.15	4.72	8.0
P100Gr	2026.79**	0.26 ^{NS}	375.02**	55.35**	31.37	42.04	13.0
V100Gr	8120.20**	35.73 ^{NS}	979.02**	136.31**	72.99	65.03	13.0
CD	323.88**	43.13 ^{NS}	49.75**	24.82 ^{NS}	22.13	83.77	6.0

*, **, NS: Diferencia significativa $\alpha=0.05$, $\alpha=0.01$, no significativa, respectivamente; gl: grados de libertad. Loc: localidades, Rep/Loc: repeticiones anidadas en localidades, Gen: genotipos o accesiones, Gen x Loc: interacción genotipo por localidades.

5.2. Selección de variables

El análisis de repetibilidad (r) mostró diferencias muy marcadas, con valores entre 0.09 y 11.78 para los caracteres estudiados; del total, 16 presentaron un valor de $r \geq 3.0$, el 63% de éstos corresponde a caracteres de mazorca (Cuadro 1.2), lo que está en concordancia con lo reportado por Goodman y Paterniani (1969). Los caracteres con $r \geq 3.0$ corresponden en su mayoría a

descriptores reproductivos, los cuales son menos afectados por los factores ambientales. En este sentido, los caracteres reproductivos reflejan alta variabilidad genética y contribuyen de mejor manera a su explicación.

Cuadro 1.2. Estimadores de los componentes de varianza y valor de repetibilidad (r). Roque, Celaya, Gto. y Los Paredones, Cd. Guzmán, Jal., México. 2010.

Variable	$\sigma^2_{Gen \times Loc}$	σ^2_{Gen}	σ^2_{Loc}	r
Floración Femenina (FF)	9.00	143.90	15.12	5.97
Floración Masculina (FM)	9.60	148.60	8.17	8.36
Sincronía Floral (SF)	1.64	0.39	2.79	0.09
Hijuelos por Planta (HijP)	0.02	0.03	0.00	1.24
Altura de Planta (AP)	325.90	2371.46	137.38	5.12
Altura de Mazorca (AMz)	320.83	1859.38	485.88	2.30
Relación AMz/AP	0.00	0.00	0.00	1.17
Hojas Totales por Planta (HojP)	0.37	3.48	1.25	2.15
Hojas Arriba de la Mazorca (HAMz)	0.05	0.25	0.40	0.57
Longitud de la Hoja de la Mazorca (LHMz)	482.67	2541.86	4009.55	0.57
Ancho de la Hoja de la Mazorca (AHMz)	0.16	0.81	-0.01	5.32
Longitud Total de la Espiga (LE)	2.51	12.08	1.26	3.21
Longitud del Tramo Ramificado de la Espiga (LTRE)	1.40	5.45	3.93	1.02
Relación LTRE/LE	0.00	0.00	0.00	0.65
Longitud del Pedúnculo de la Espiga (LPE)	0.49	4.70	0.06	8.52
Longitud de la Rama Central de la Espiga (LRCE)	2.42	4.88	0.65	1.59
Ramas Primarias de la Espiga (RPE)	1.47	7.12	2.25	1.91
Largo de Mazorca (LMz)	0.85	5.24	0.20	5.02
Diámetro de Mazorca (DMz)	0.02	0.12	0.00	6.08
Relación LMz/DMz	0.04	0.25	0.00	5.75
Hileras por Mazorca (HMz)	0.52	3.75	0.29	4.65
Longitud del Pedúnculo de la Mazorca (LPMz)	3.40	5.29	12.19	0.34
Diámetro del Olote (DO)	0.01	0.06	0.00	7.53
Largo de Grano (LGr)	0.05	1.05	0.08	7.63
Ancho de Grano (AGr)	0.09	1.82	0.06	11.78
Relación AGr/LGr	0.00	0.01	0.00	5.22
Espesor de Grano (EGr)	0.04	0.20	0.02	3.47
Peso de 100 Granos (P100Gr)	11.99	79.92	11.13	3.46
Volumen de 100 Granos (V100Gr)	31.66	210.90	44.56	2.77
Coefficiente de desgrane (GrMz, %)	1.34	6.23	1.54	2.16

σ^2_{Gen} : componente de varianza para genotipos o accesiones; σ^2_{Loc} : para localidades; $\sigma^2_{Gen \times Loc}$: para interacción entre genotipos y localidades y r = coeficiente de repetibilidad.

5.3. Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales, indicó que los primeros cinco componentes explican 88% del total de la variación observada y los dos primeros cerca de 60% (datos no

mostrados). Pla (1986) menciona que una alta proporción explicada con un bajo número de componentes, permite mejor interpretación de la variación.

Las variables que presentaron mayores valores absolutos en los coeficientes de los vectores propios de los dos primeros componentes, y que determinan de manera relevante la dispersión racial así como la formación de grupos fueron: para el componente uno FM, LMz, AGr y P100Gr, y para el componente dos AHMz, HMz, AGr/LGr y EGr (Cuadro 1.3).

Cuadro 1.3. Vectores propios asociados a los dos primeros componentes principales del análisis de 16 variables, en 88 accesiones tipo de 10 razas de maíz. Roque, Celaya, Gto. y Los Paredones, Cd. Guzmán, Jal., México. 2010.

Variable	Vector Propio	
	CP-1	CP-2
Días a floración femenina (FF)	0.298	0.242
Días a floración masculina (FM)	0.301	0.223
Altura de planta (AP)	0.270	0.268
Ancho de la hoja de la mazorca (AHMz)	0.230	0.343
Longitud de la espiga (LE)	0.296	0.069
Longitud del pedúnculo de la espiga (LPE)	-0.021	-0.105
Longitud de la mazorca (LMz)	0.346	0.033
Diámetro de la mazorca (DMz)	0.086	0.321
Relación LMz/DMz	0.277	-0.157
Número de hileras de la mazorca ((HMz)	-0.262	0.333
Diámetro del olote (DO)	0.136	0.189
Longitud de grano (LGr)	0.103	0.295
Ancho de grano (AGr)	0.331	-0.226
Relación AGr/LGr	0.246	-0.387
Espesor del grano (EGr)	0.187	-0.316
Peso de 100 granos (P100Gr)	0.316	-0.155

La dispersión de las accesiones de acuerdo con los dos primeros componentes principales permite diferenciar los siguientes cuatro grupos (Figura 1.1):

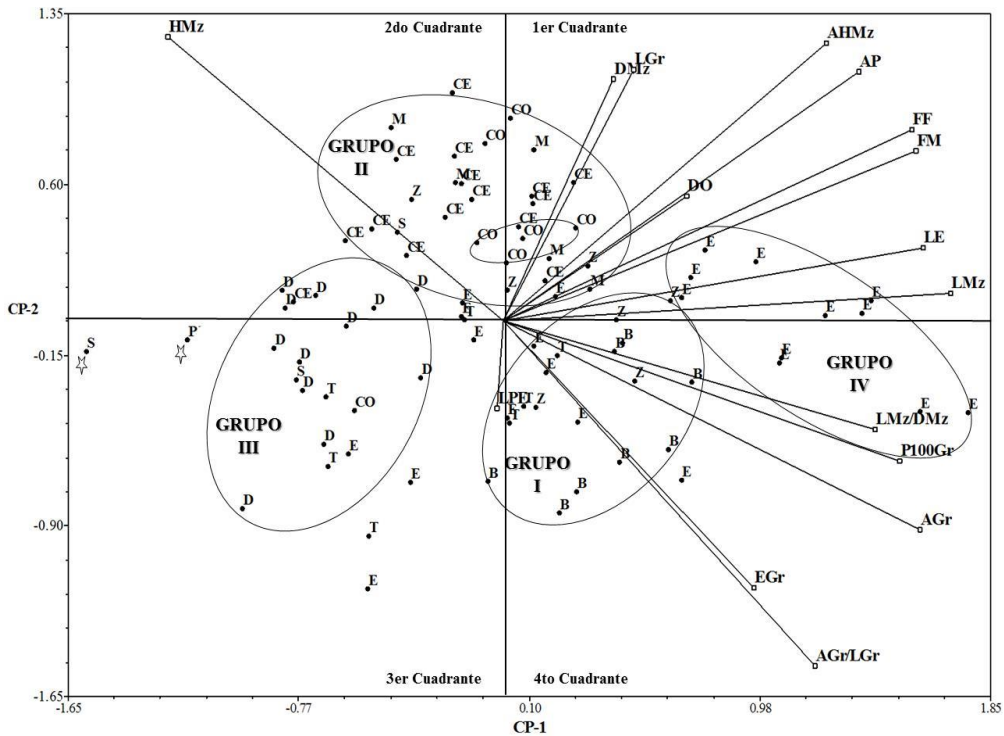


Figura 1.1. Dispersión de 88 accesiones representativas de 10 razas de maíz con base en los dos primeros componentes principales. B= Bofo, CE= Celaya, CO= Coscomatepec, D= Dulce, E= Elotes Occidentales, M= Mushito, P= Palomero de Jalisco, S= Serrano de Jalisco, T= Tablilla de Ocho, Z= Zamorano Amarillo.

Grupo I: integrado por 100% de las accesiones de la raza Bofo, 57% Zamorano Amarillo, 43% Tablilla de Ocho y 17% de Elotes Occidentales, que comparten características morfológicas relacionadas con LPE (26.97 cm), EGr (5.01 mm), AGr (10.9 mm), P100Gr (49.46 g) y las relaciones LMz/DMz (4.62) y AGr/LGr (0.90). La agrupación total de las accesiones de la raza Bofo es indicativa de una marcada diferenciación genética de éstas. El bajo número de accesiones de las otras razas en este grupo, posiblemente se debe a que estas accesiones comparten cierta área geográfica en su distribución (100 a 1400 msnm) y a una mayor variabilidad, aunque también es posible que la identificación racial *a priori* no haya sido del todo acertada. Estas razas fueron clasificadas por Sánchez y Goodman (1992) y por Sánchez *et al.* (2000) dentro de un grupo de maíces denominado de “Ocho Hileras” y en particular Zamorano Amarillo como un subgrupo dentro de éste. De acuerdo con Wellhausen *et al.* (1951) y Hernández y Alanís (1970), las razas Bofo y Tablilla de Ocho comparten como ancestro común a la raza Tabloncillo, lo que también explica en parte la ubicación de ambas razas en este grupo.

Grupo II: integra 100% de las accesiones de Mushito, 86% de Celaya, 86% de Coscomatepec, 43% de Zamorano Amarillo, 33% de Serrano de Jalisco y 8% de Elotes Occidentales. Las características morfológicas que distinguen a este grupo son: HMz (13.13 hileras), DMz (4.80 cm), LGr (13.11 mm), AHMz (9.20 cm), AP (261.04 cm), FF (86.81 días) y FM (84.79 cm). Considerando el número de accesiones, en este grupo predomina la raza Celaya, que es una raza bien definida (Wellhausen *et al.*, 1951; Sánchez y Goodman, 1992), mientras que Mushito se considera una raza no bien definida (Wellhausen *et al.*, 1951; Bretting y Goodman, 1989), que además no cuenta con un número de accesiones considerable y representativas en los bancos de germoplasma, al igual que el resto de las razas en este grupo, y aun cuando tienen cierta semejanza con la raza Celaya, sus características sugieren que constituyen grupos genéticos diferentes, los cuales requieren ser estudiados con mayor profundidad, esto concuerda con Hernández y Alanís (1970) y Sánchez y Goodman (1992).

Grupo III: lo integran 92% de las accesiones de Dulce, 33% de Serrano de Jalisco, 28% de Tablilla de Ocho, 14% de Coscomatepec, 6% de Celaya y 4% de Elotes Occidentales. En general son las poblaciones más precoces, baja altura de planta y de mazorca, tamaño reducido de espiga, de mazorca y de grano (72.57 días a FF, 71.51 días a FM, 194.95 cm de AP, 13.45 HMz, 7.38 cm del AHMz, 39.03 cm de LE, 25.52 cm de LPE, 15.68 cm de LMz, 36.19 g en P100Gr, 4.45 cm de DMz, 11.55 mm de LGr, 8.95 mm del AGr y 4.88 mm del EGr), ubicándose preponderantemente este grupo en el tercer cuadrante de la Figura 1.1; es decir, las accesiones presentan en general valores negativos de los dos primeros componentes principales.

Grupo IV: integrado únicamente por 48% de las accesiones de Elotes Occidentales las cuales se caracterizan por ser tardías FF y FM (106.45, 106.68 días), con mazorcas y espigas grandes (LMz, 21.10 cm; LE, 49.07 cm), grano pesado (P100Gr, 57.96 g) y LMz/DMz de 4.60, lo que indica mazorcas esbeltas propias para su consumo en fresco.

5.4. Análisis de conglomerados

En el dendrograma de la Figura 1.2 puede apreciarse una diferenciación continua de menor a mayor distancia euclidiana entre accesiones y grupos. Al respecto, Sánchez *et al.* (2000)

reportan que las razas de maíz se agrupan en un continuo con respecto a una zona geográfica, de acuerdo con su precocidad u otros caracteres. La diversidad que se encontró en este análisis, se manifiesta en cuatro grupos a partir de una distancia euclidiana de 5.16, que coinciden entre 68 y 100% con las tendencias de agrupamientos en el análisis de componentes principales (Figura 1.1), lo que confirma que las razas mejor definidas son para el grupo 1 Bofo; para el 2 Celaya, con el resto de las razas en pequeños grupos o bajo un continuo; para el 3 Dulce y para el 4 Elotes Occidentales.

5.5. Análisis discriminante

En el análisis discriminante se encontró que 55% de las 88 accesiones tienen una probabilidad mayor al 80% de pertenecer a una raza específica, que son las que se proponen para integrar la colección de referencia racial, marcadas en negritas en el Cuadro 1.4, la cual resulta de suma importancia para hacer más eficiente el manejo del recurso genético en los bancos de germoplasma al facilitar la correcta clasificación de materiales nuevos o la enmendación de errores en los datos de pasaporte de las accesiones ya existentes. El número de accesiones de cada raza que cumplen esta condición son: Bofo: 7, Celaya: 8, Dulce: 8, Coscomatepec: 3, Elotes Occidentales: 12, Tablilla de Ocho: 4, Zamorano Amarillo: 4, Mushito: 2, Palomero de Jalisco: 1 y Serrano de Jalisco: 1. El resto de las accesiones presentan mayor grado de incertidumbre, probablemente a causa de infiltración genética de germoplasma de otras razas dentro de las accesiones, lo que conlleva a tener un continuo de diversidad en ellas. Wellhausen *et al.* (1951) mencionan que es necesario considerar la naturaleza continua de las colectas, pues existen accesiones intermedias debido a la introgresión de una raza a otra, que en el largo plazo pueden conducir al establecimiento de nuevas razas con identidad propia.

Cuadro 1.4. Probabilidad de las accesiones evaluadas de pertenecer a una de las 10 razas de maíz, mediante análisis discriminante.

Accesión	Raza <i>a priori</i>	Raza más probable (%)	Accesión	Raza <i>a priori</i>	Raza más probable (%)
Dura-94	B	E(81.32)	63	E	E(99.31)
Dura-95	B	E(47.43)	134	E	E(90.95)
Dura-122	B	B(96.05)	156	E	E(82.07)
Jali-289	B	B(41.93)	169	E	E(98.30)
Naya-38	B	B(98.24)	174	E	E(91.59)
Naya-191-C	B	E(98.36)	179	E	E(89.75)
Naya-191-SL	B	Z(74.73)	204	E	E(90.13)
Naya-222	B	B(37.97)	207	E	E(99.36)
Dura-36	CE	D(49.69)	217	E	E(98.73)
Dura-218	CE	CE(70.44)	272	E	B(99.18)
Guan-69	CE	CE(74.00)	338	E	Z(61.10)
Guan-101	CE	M(60.20)	Gto-1-SL	E	D(93.82)
Guan-185	CE	CE(84.77)	Guan-1-C	E	B(81.28)
Guan-192	CE	CE(99.91)	Guer-203	E	E(55.05)
Jal-484	CE	CE(60.16)	Jali-633	E	E(59.35)
Jali-628	CE	CE(95.17)	Naya-29	E	B(95.64)
Mor-68	CE	CE(70.50)	Quer-94	E	D(42.53)
Oax-514	CE	CO(82.92)	SNLP- 50	E	T(39.57)
Pueb-355	CE	M(77.92)	Zaca-172	E	E(55.76)

...continuación Cuadro 1.4.

SNLP-141	CE	CE(97.23)	Zaca-181	E	B(99.38)
SNLP-174	CE	M(71.38)	Zaca-210	E	E(76.62)
Zaca-64	CE	CE(49.26)	Mich-89	M	Z(61.53)
Zaca-213	CE	CE(97.84)	Mich-323	M	CE(96.61)
Pueb-865	CO	CO(90.18)	Mich-371	M	M(77.94)
Vera-406	CO	M(91.64)	Pueb-742	M	M(50.10)
Vera-477	CO	S(63.32)	Pueb-743	M	CO(57.02)
Vera-478	CO	CO(80.93)	Jali-159	P	P(100.00)
Vera-487	CO	CE(99.17)	Jali-146	S	P(100.00)
Vera-497	CO	CE(49.23)	Jal-159	S	CE(96.17)
Vera-500	CO	M(73.61)	Jal-162	S	M(50.65)
Guan-141	D	D(99.63)	Dura-96	T	T(93.24)
Guan-181	D	S(61.14)	Naya-185	T	Z(63.71)
Jal-78-C	D	D(97.34)	Naya-193	T	T(99.91)
Jali-78-SL	D	D(69.87)	Naya-198	T	T(97.52)
Jali-204	D	D(100.00)	Zaca-47	T	T(92.64)
Jali-300-C	D	T(54.97)	Zaca-187	T	T(46.50)
Jali-300-SL	D	D(100.00)	Zaca-191	T	T(79.18)
Jali-304-C	D	D(99.98)	Guan-191	Z	E(54.60)
Jali-304-SL	D	D(83.77)	Jali-513	Z	Z(99.33)
Sina-88	D	M(65.03)	Jali-673	Z	Z(82.03)
Zaca-79	D	D(99.36)	Mich-5	Z	Z(89.35)
Zaca-182	D	D(83.69)	Mich-62	Z	Z(97.91)
9	E	E(79.57)	Mich-261	Z	B(95.11)
22	E	E(99.98)	Mich-372	Z	M(99.79)

B: Bofo; CE: Celaya; CO: Coscomatepec; D: Dulce; E: Elotes Occidentales; M: Mushito; P: Palomero de Jalisco; S: Serrano de Jalisco; T: Tablilla de Ocho; Z: Zamorano Amarillo. Valores en negrita indican accesiones con probabilidad mayor al 80% de pertenecer a una raza.

6. CONCLUSIONES

Existe una alta diversidad fenotípica para los caracteres evaluados entre las accesiones de las diez razas de maíz estudiadas. Se confirmó una clara diferenciación de las razas Bofo, Celaya, Elotes Occidentales y Dulce, previamente bien definidas y con suficiente representación en los bancos de germoplasma. Las accesiones de las razas Coscomatepec, Mushito y Zamorano Amarillo, tienden a agruparse en pequeños conglomerados a manera de un continuo, mientras que Serrano de Jalisco, Palomero de Jalisco, Tablilla de Ocho, no se definen en ninguna agrupación, por lo que es necesario profundizar este tipo de estudios en estas razas con un mayor número de accesiones y con estrategias adicionales como los marcadores moleculares. Se propone una colección de accesiones representativas en algunas de las razas estudiadas, para su uso como referencia en estudios posteriores y para facilitar el manejo de germoplasma en los bancos de germoplasma.

7. LITERATURA CITADA

- Anderson E, H C Cutler (1942)** Races of *Zea mays*: I. Their recognition and classification. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 29: 69-88.
- Bellon M R, A F Barrientos-Priego, P Colunga-García Marín, H Perales, J A Reyes A, R Rosales S, D Zizumbo-Villarreal (2009)** Diversidad y conservación de recursos genéticos en plantas cultivadas. *In: Capital Natural de México. Vol. II: Estado de Conservación y Tendencias de Cambio. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D. F. pp: 355-382.*
- Bretting P K, M M Goodman (1989)** Karyotypical variation in Mesoamerican races of maize and its systematic significance. *Economic Botany* 43: 107-124.
- Castillo G F (1993)** La variabilidad genética y el mejoramiento genético de los cultivos. *Ciencia* 44: 69-79.
- Chávez-Servia J L, P Diego-Flores, J C Carrillo-Rodríguez (2011)** Complejos raciales de poblaciones de maíz evaluadas en San Martín Huamelulpan, Oaxaca. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable Ra Ximhai* 7: 107-115.
- CONABIO (2013)** La Diversidad Biológica de México: Maíces-Razas de maíz. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. Disponible en <http://www.biodiversidad.gob.mx/ usos/maices/razas2012.html> (Consultado febrero, 2013).
- Goodman M M, E Paterniani (1969)** The races of maize: III. Choices of appropriate characters for racial classification. *Economic Botany* 23: 265-273.
- Hernández X E, G Alanís F (1970)** Estudio morfológico de cinco nuevas razas de maíz de la Sierra Madre Occidental de México. Implicaciones filogenéticas y fitogeográficas. *Agrociencia* 5: 3-30.
- Herrera C B E, F Castillo G, J J Sánchez G, R Ortega P, M M Goodman (2000)** Caracteres morfológicos para valorar la diversidad entre poblaciones de maíz en una región: caso la raza Chalqueño. *Revista Fitotecnia Mexicana* 23: 355-354.
- Herrera-Cabrera B E, F Castillo-González, J J Sánchez-González, J M Hernández-Casillas, R Ortega-Pazkca, M M Goodman (2004)** Diversidad de maíz Chalqueño. *Agrociencia* 38: 191-206.

- Hortelano S R R, A Gil M, A Santacruz V, S Miranda C, L Córdova T (2008)** Diversidad morfológica de maíces nativos del Valle de Puebla. *Agricultura Técnica en México*. 34: 189-200.
- Matsuoka Y, Y Vigouroux, M M Goodman, J Sánchez G, 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.
- Mijangos-Cortés J O, T Corona-Torres, D Espinosa-Victoria, A Muñoz-Orozco, J Romero-Peñaloza, A Santacruz-Varela (2007)** Differentiation among maize (*Zea mays* L.) landraces from the Tarasca Mountain Chain, Michoacan, Mexico and the *Chalqueño* complex. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 309-325.
- Muñoz O A (2003)** Centli Maíz. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 211 p.
- Ortega P R A, J J Sánchez G, F Castillo G, J M Hernández C (1991)** Estado actual de los estudios sobre maíces nativos de México. *In: Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos de México*. Ortega P R, G Palomino H, F Castillo G, V A González H, M Livera M (eds.). Sociedad Mexicana de Fitogenética, A. C., Chapingo, Edo. de México. pp: 161-185.
- Pla E L (1986)** Análisis Multivariado: Método de Componentes Principales. Colección de Monografías Científicas. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D. C. 95 p.
- Rao C R (2002)** Linear Statistical Inference and its Applications. 2nd. Edition. Wiley Series in Probability and Statistics. John Wiley & Sons Inc. New York. 656 p.
- Rohlf F J (2009)** NTSYSpc: numerical taxonomy system. Version 2.21h. Exeter Software: Setauket: New York.
- Sánchez G J J (1995)** El análisis biplot en clasificación. *Revista Fitotecnia Mexicana* 18:188-203.
- Sánchez G J J, M M Goodman (1992)** Relationships among the Mexican races of maize. *Economic Botany* 46: 72-85.
- Sánchez G J J, M M Goodman, O Rawlings (1993)** Appropriate characters for racial classification in maize. *Economic Botany* 47: 44-59.
- Sánchez G J J, M M Goodman, C W Stuber (2000)** Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Economic Botany* 54: 43-59.

Sinobas J, M Díaz (1999) Relaciones entre diferentes razas de maíz españolas y dos sintéticos americanos. Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetales. 14: 5-14.

SAS Institute (2002) The SAS[®] System for Windows[®] (Version 9.3). Statistical Analysis System Institute Inc. Cary, N.C., U.S.A. 4424 p.

Wellhausen E J, L M Roberts, E Hernández X (en colaboración con 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.

CAPÍTULO II

DIVERSIDAD GENÉTICA DE DIEZ RAZAS MEXICANAS DE MAÍZ, MEDIANTE MICROSATÉLITES

1. RESUMEN

Se estudió la diversidad genética y las interrelaciones entre poblaciones de diez razas de maíz y dos de teocintle, mediante el polimorfismo de marcadores moleculares del tipo SSR. Se obtuvieron las frecuencias alélicas, el número de alelos por *locus* (AL), alelos exclusivos (AE), proporción de *loci* polimórficos (PLP), índice de heterocigosidad esperada (H_e) y los estadísticos F de Wright (F_{IS} , F_{ST} y F_{IT}). Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) y otro de conglomerados por el método de agrupamiento Neighbor-Joining. Se detectaron 646 alelos en total, con 20.81 AL, el 30.95% de éstos (200 alelos) presentaron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre los 12 grupos genéticos. Se detectaron 127 AE (19.66%); las razas Elotes Occidentales y Celaya tuvieron el mayor número de AE; la PLP fue alta, 92.51%; la $H_e = 0.746$, significa alta diversidad genética de las poblaciones. Los efectos de diferenciación genética se ven reflejados en la fijación de alelos homocigotos (endogamia) en las poblaciones lo que se expresó con un $F_{IS} = 0.149$, esto manifiesta deficiencia de heterocigotos, el $F_{ST} = 0.380$ indica diferenciación muy fuerte y por ende flujo genético reducido entre las poblaciones de cada grupo (72% de la variación genética reside entre los individuos dentro de poblaciones); el $F_{IT} = 0.271$ manifiesta que el flujo genético se da entre poblaciones. En el ACP, el 53.6% de la varianza global se explica con los 10 primeros componentes; las poblaciones se agruparon en tres estratos con los CP1, CP2 y CP4; en el árbol filogenético se definieron cinco grupos de razas. Este estudio revela que las razas de maíz comparten un origen en común y se relacionan entre ellas sobre la base de marcadores estables y neutros, como los SSR, los cuales proporcionan información útil dentro de un esquema de mejoramiento genético.

Palabras clave: *Zea mays* L., marcadores moleculares, SSR, diversidad genética, relaciones inter-raciales.

GENETIC DIVERSITY OF TEN MEXICAN RACES OF MAIZE, THROUGH MICROSATELLITES

2. SUMMARY

Genetic diversity and racial interrelations among populations of ten races of maize and two teosintes were studied through the use of SSR molecular markers. The allelic frequencies, number of alleles per *locus* (AL), exclusive alleles (AE), proportion of polymorphic *loci* (PLP), expected heterozygosity index (He), and Wright F-Statistics (F_{IS} , F_{ST} and F_{IT}) were obtained. A principal component analysis (ACP) was performed, and a phylogenetic tree was constructed using cluster analysis with the Neighbor-Joining method. A total of 646 alleles were detected, with 20.81 AL, 30.95% of these (200 alleles) have significant ($\alpha = 0.05$) differences among the 12 genetic groups. Results also detected 127 AE (19.66%), where the races Elotes Occidentales and Celaya had the highest number of AE; the PLP was high, 92.51%, He = 0.746 which represents larger genetic diversity of populations. The effects of genetic differentiation are reflected in the fixation of homozygous alleles (endogamy) in the populations were expressed with an $F_{IS} = 0.149$, which manifests deficiency of heterozygotes, the $F_{ST} = 0.380$ indicates very strong differentiation among populations and thus, a reduced genetic flow among the population of each group (72% of the genetic variation resides among individuals within populations), the $F_{IT} = 0.271$ which manifests that the genetic flow is given within populations. In the ACP, 53.6% of global variance was explained with ten component, and the populations were grouped into three strata with the CP1, CP2 and CP4. In the phylogenetic tree, five groups of races were defined. This study reveals that the races of maize share a common origin and relation amongst themselves based on the basis of stable and neutral markers, such as SSR, which provide useful information within a breeding scheme.

Index words: *Zea mays* L., molecular markers, SSR, genetic diversity, inter-racial relationships.

3. INTRODUCCIÓN

México forma parte de los 12 países megadiversos; ocupa el quinto lugar por riqueza en número de especies animales y vegetales. Un ejemplo emblemático de esta diversidad es la del maíz, generada por la interacción de las culturas humanas con los recursos naturales (Kato *et al.*, 2009).

Se estima que en México, existen más de 60 razas de maíz (Sánchez *et al.*, 2000); múltiples estudios han aportado conocimiento sobre su diversidad y variabilidad genética, como el de Wellhausen *et al.* (1951), Goodman y Paterniani (1969), Sánchez *et al.* (1993), entre otros. Para tales estudios se ha generado información de tipo morfológica, fisiológica, distribución geográfica, genética y citogenética, que se pueden considerar métodos clásicos en el estudio del maíz; sin embargo, muchas de las variables morfológicas son influenciadas por el ambiente, lo que puede ocasionar diferentes patrones de variación entre diferentes estudios (Santacruz-Varela *et al.*, 2004). En este sentido, Doebley *et al.* (1984) señala que la selección de variables en estudios de diversidad genética debe reflejar diferencias genéticas y exhibir expresión estable a través de ambientes.

El surgimiento y uso de los marcadores genéticos moleculares dieron nueva dimensión a los estudios de diversidad genética en maíz (Sánchez *et al.*, 2000; Reif *et al.*, 2006; López *et al.*, 2009), con ventajas sobre otros tipos de marcadores al no ser afectados por el ambiente y por lo general son selectivamente neutros, por lo tanto, evolucionan en su mayoría como resultado de mutaciones (Rajwant *et al.*, 2011).

Los microsatélites, conocidos como secuencias simples repetidas en serie (SSR, por sus siglas en inglés), son marcadores moleculares, que han demostrado ser confiables para la generación de huellas genómicas, descripción y sistematización de la diversidad entre y dentro de poblaciones, superando los inconvenientes que presentan los métodos morfológicos (Rajwant *et al.*, 2011). Estos generan información genotípica, que sometida al uso de modernas herramientas estadísticas tienen la capacidad para discriminar la pertenencia o no de poblaciones de origen diverso a un determinado grupo taxonómico (Valadez y Kahl, 2005). Además, los SSR

presentan variación altamente polimórfica, reproducible, de herencia co-dominante y multialélica, por lo que son altamente informativos (Becher *et al.*, 2000); adicionalmente, son abundantes, están distribuidos a lo largo del genoma y son de fácil detección (Lee *et al.*, 2004).

La eficiencia de los *loci* de SSR para el estudio de la diversidad genética y clasificación en maíz ha sido validada por varios autores (Santacruz-Varela *et al.*, 2004; Reif *et al.*, 2006; Labate *et al.*, 2003).

Con la finalidad complementar los estudios que se tienen en maíz en los que se emplean caracteres morfológicos, así como por las ventajas que proporcionan los marcadores moleculares de SSR, en estudios de diversidad y con base en el contexto anterior el presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la diversidad genética y las interrelaciones raciales entre poblaciones de diez razas mexicanas de maíz de altitudes intermedias mediante marcadores moleculares del tipo SSR (microsatélites).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Se estudiaron 87 poblaciones representativas de 10 razas mexicanas de maíz: Bofó (8 poblaciones), Celaya (15), Coscomatepec (7), Dulce (12), Elotes Occidentales (23), Mushito (5), Palomero de Jalisco (1), Serrano de Jalisco (2), Tablilla de Ocho (7) y Zamorano Amarillo (7); se incluyeron dos poblaciones de teocintle como grupo externo, una perteneciente a la raza Chalco (*Zea mays* ssp. *mexicana* (Schrader) Iltis) y otra a la raza Balsas (*Zea mays* ssp. *parviglumis* Iltis & Doebley). La semilla fue obtenida de los bancos de germoplasma del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, de la Universidad Autónoma Chapingo, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias y del Colegio de Postgraduados.

4.2. Análisis y detección de microsatélites

Se extrajo ADN de 25 individuos por población a partir de 100 mg de tejido del coleóptilo-mesocótilo de plántulas de una semana de edad, con el paquete comercial de aislamiento de ADN “Charge Switch gDNA Plant Kit” (Invitrogen), robot de extracción de ADN (Thermo Scientific[®], King Fhisher Flex, Waltham, MA). Con un espectrofotómetro de ultra-bajo volumen (NanoDrop 2000-Thermoscientific[®], Spectrophotometer UV-Vis) se determinó la calidad (absorbancia a 260/280) y concentración del ADN.

Se realizó PCR-Multiplex con iniciadores organizados en grupos para la amplificación del ADN. Se utilizaron 31 *loci* de SSR distribuidos a través del genoma del maíz, los cuales se obtuvieron de la base de datos “Maize Genetics and Genomics Database” (MaizeGDB, por sus siglas en inglés, en <http://www.maizegdb.org/ssr.php#>). Los 31 pares de iniciadores fueron marcados con etiquetas fluorescentes 6-FAM, ROX y HEX en el extremo 5’ (Cuadro 2.1) para su posterior detección.

Cuadro 2.1. Loci de microsatélites e iniciadores con etiqueta fluorescente utilizados para la amplificación de SSR en poblaciones de 10 razas de maíz.

Grupo	Locus	Número de Bin	Unidad repetitiva	Tamaño de fragmento (pb)	Iniciador hacia adelante//iniciador en reversa
1	phi127	2.07	GTGC	111-134	ROX-ATATGCATTGCCTGGAAGGAA//AATTCAAACACGCCTCCCGAGTGT
	phi051	7.06	AGG	131-150	6-FAM-GCGAAAGCGAACGACAACAATCTT//ACATCGTCAGATTATATTGCAGACCA
	phi115	8.03	ATAC	291-307	HEX-GCTCCGTGTTTCGCCTGAA//ACCATCACCTGAATCCATCACA
	phi015	8.08	TTTG	74-128	HEX-GCAACGTACCGTACCTTTCCGA//ACGCTGCATTCAATTACCGGGAAG
	phi033	9.02	CCT	234-265	6-FAM-ATCGAAATGCAGGCGATGGTTCTC//ATCGAGATGTTCTACGCCCTGAAGT
2	phi053	3.05	ATGT	170-214	ROX-CTGCCTCTCAGATTCAGAGATTGAC//AACCCAACGTACTCCGGCAG
	phi072	4.01	CAAA	127-164	6-FAM-GTGCATGATTAATTTCTCCAGCCTT//GACAGCGCGCAAATGGATTGAACT
	phi093	4.08	CTAG	275-290	ROX-GTGCCTCAGCTTCATCGCCTACAAG//CCATGCATGCTTGCAACAATGGATACA
	phi024	5.01	CCT	354-375	HEX-CTCCGCTTCCACTGTTCCA//TGTCCGCTGCTTCTACCCA
	phi085	5.06	GCGTT	231-265	6-FAM-AGCAGAACGGCAAGGGCTACT//TTTGGCACACCACGACGA
	phi034	7.02	CCT	121-152	HEX-TAGCGACAGGATGGCCTCTTCT//GGGGAGCACGCCTTCGTTCT
	phi121	8.04	CCG	93-104	6-FAM-AGGAAAATGGAGCCGGTGAACCA//TTGGTCTGGACCAAGCACATACAC
3	phi056	1.01	GCC	236-259	ROX-ACTTGCTTGCCCTGCCGTTAC//CGCACACCACTTCCCAGAA
	phi064	1.11	ATCC	66-119	HEX-CGAATTGAAATAGCTGCGAGAACCT//ACAATGAACGGTGGTTATCAACACGC
	phi050	10.03	AAGC	79-93	ROX-AACATGCCAGACACATACGGACAG//ATGGCTCTAGCGAAGCGTAGAG
4	phi96100	2.01	ACCT	232-299	6-FAM-AGGAGGACCCCAACTCCTG//TTGCACGAGCCATCGTAT
	phi101249	?	AGAT	111-171	6-FAM-TTCCTCCTCCACTGCCTC//AAGAACAGCGAAGCAGAGAAGG
	phi109188	5.03	AAAG	145-180	HEX-AAGCTCAGAAGCCGGAGC//GGTCATCAAGCTCTCTGATCG
5	phi029	3.04	AG-AGGG	144-177	ROX-TCTTTCTTCTCCACAAGCAGCGAA//TTTCCAGTTGCCACCGACGAAGAACTT
	phi073	3.05	AGC	183-201	HEX-GTGCAGAGAGGCTTGACCAA//AAGGGTTGAGGGCGAGGAA
	phi96342	10.02	ATCC	230-251	6-FAM-GTAATCCCACGTCTATCAGCC//TCCAACCTGAACGAACCTCCTC
	phi109275	1.03	AGCT	118-149	6-FAM-CGGTTCATGTAGCTCTGC//GTTGTGGCTGTGGTGGTG
6	phi427913	1.01	ACG	118-145	ROX-CAAAAGCTAGTCGGGGTCA//ATTGTTGATGACACACTACGC
	phi265454	1.11	AGG	216-236	6-FAM-CAAGCACCTCAACCTCTTCG//TCCACGCTGCTCACCTTC
	phi402893	2XX	AGC	202-247	HEX-GCCAAGCTCAGGGTCAAG//CACGAGCGTTATTCTGCTGT
7	phi346482	1.XX	AGG	114-152	HEX-GCATCACACTTCACACAACAA//GTGGAATAGGAGGCGAGAGAGG
	phi308090	4.04-4.05	AGC	197-226	6-FAM-CAGTCTGCCACGAAGCAA//CTGTCGGTTTTCGGTCTTCTT
	phi330507	5.02-5.06	CCG	131-157	ROX-GTAAAGTACGATGCGCCTCCC//CGGGGTAGAGGAGAGTTGTG
8	phi213398	4.01-4.04	ACC	285-303	6-FAM-GTGACCTAAACTTGGCAGACCC//CAAGAGGTACCTGCATGGC
	phi339017	1.03	AGG	139-163	HEX-ACTGCTGTTGGGGTAGGG//GCAGCTTGAGCAGGAAGC
	phi159819	6.00-6.08	CCG	121-142	6-FAM-GATGGGCCCTAGACCAGCTT//GCCTCTCCCATCTCTCGGT

El ADN se diluyó a una concentración de $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, con agua HPLC. Cada mezcla de reacción de PCR-Multiplex contuvo: $2 \mu\text{L}$ de 10X Buffer PCR (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9.0 a 25°C); $0.4 \mu\text{L}$ de 10 mM dNTPs (2.5 mM cada dNTP); $1.2 \mu\text{L}$ de 25 mM MgCl_2 ; $0.2 \mu\text{L}$ de Taq ADN polimerasa (1 unidad total; GoTaq Flexi DNA Polymerase, Promega); $2.5 \mu\text{L}$ de ADN molde ($10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$); $2.0 \mu\text{L}$ de 4 pM de cada par de iniciadores ($1 \mu\text{L}$ de cada uno) y agua HPLC.

La PCR-Multiplex consistió de 4 min de desnaturalización inicial a 95°C , seguido de 25 ciclos de 1 min a 95°C ; 2 min de alineación a 55°C ; 2 min de extensión a 72°C ; extensión final de 1 h a 72°C .

La lectura de los *loci* SSR se realizó mediante inyección electrocinética de las muestras y electroforesis capilar en un secuenciador de ADN (Genetic Analyzer ABI 3130[®], Applied Biosystems, Foster City, CA). Para estimar el tamaño de los alelos se utilizó LIZ-500 como marcador estándar interno de ADN con tamaños de fragmento conocidos. La reacción que se ingresó al secuenciador consistió de $0.3 \mu\text{L}$ del producto de PCR con $9.7 \mu\text{L}$ de Mix ($9.8 \mu\text{L}$ de Formamida y $0.2 \mu\text{L}$ de LIZ-500) a un volumen final de $10 \mu\text{L}$, se llevó a cabo un choque térmico colocando las muestras en un termociclador (Bio Rad[®], My Cycler-thermal cycler 580BR 5693) a 96°C por 3 min, y después en congelador a 0°C por 3 min, para separar las cadenas de ADN. La identificación de los alelos se hizo con el programa GeneMapper[®] (Applied Biosystems, 2005).

4.3. Análisis estadístico

Se calcularon las frecuencias alélicas para los 31 *loci* SSR para cada una de las 89 poblaciones. Para evitar problemas de distanciamiento e interpretación de datos que se generan con alelos no significativos, se eliminó la información de aquellos que no presentaron significancia estadística ($\alpha \leq 0.05$) en un análisis de varianza simple, con raza como fuente de variación. Se determinó, el número de alelos por *locus* (AL), alelos exclusivos (AE), proporción de *loci* polimórficos (PLP) considerando la frecuencia del alelo más frecuente igual o menor a 0.99, índice de heterocigosidad esperada (H_e) y la estructura genética de las poblaciones por

medio de los estadísticos F de Wright, que describen el grado de los efectos de endogamia o el cambio de las frecuencias alélicas causado por deriva génica favoreciendo la fijación de homocigotos de forma jerárquica, dentro de poblaciones (F_{IS}), entre poblaciones (F_{ST}) y dentro de la población entera (F_{IT}). Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) y uno de conglomerados, con base en las frecuencias alélicas discriminadas. Se construyó una matriz de correlaciones para realizar el ACP; mientras que para el análisis de conglomerados se calcularon las distancias genéticas de Rogers modificadas por Wright (1978) y se obtuvo un árbol filogenético por el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987); estos análisis se realizaron con los paquetes estadísticos POPGENE, versión 1.31 (Yeh *et al.*, 1999), Statistical Analysis System (SAS) versión 9.3 para Windows (SAS Institute, 2002) y NTSYSpc versión 2.21h (Rohlf, 2009).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Parámetros de diversidad genética

Las frecuencias alélicas del conjunto de las 87 poblaciones de maíz y dos de teocintle (2225 individuos) para los 31 microsatélites revelaron la existencia de 646 alelos, con 20.81 alelos por *locus* (Cuadro 2.2). Esto difiere de los 2.7 AL que reportaron para 21 microsatélites Wietholter *et al.* (2008), en 37 razas de maíz brasileñas (740 individuos totales); de los 7.8 AL reportados por Reif *et al.* (2006), en 24 razas mexicanas de maíz (24 individuos totales, uno por raza), analizadas con 25 SSR; y de los 12.6 AL en promedio de 16 razas de maíz y teocintle (96 individuos) y 6.9 AL en promedio de 101 líneas endogámicas (un individuo por línea), que reportan Matsuoka *et al.* (2002), analizadas con 46 *loci* SSR. Las diferencias encontradas en esta investigación con respecto a estudios previos se deben probablemente al número de accesiones y razas analizadas, al número de individuos, por accesión, y al número de *loci* SSR que se trabajaron en cada caso.

Cuadro 2.2. Parámetros de diversidad genética correspondiente a diez razas de maíz y dos teocintles con 31 loci de microsatélites.

Raza	Número de accesiones	Número de alelos	Alelos por locus	Alelos exclusivos	Porcentaje de loci polimórficos	He ^y
Bofo	8	345	11.13	13	95.97	0.623
Celaya	15	417	13.45	22	74.84	0.679
Coscomatepec	7	317	10.22	4	96.31	0.606
Dulce	12	354	11.42	7	94.35	0.595
Elotes Occidentales	23	482	15.55	43	95.93	0.644
Mushito	5	345	11.13	7	97.42	0.665
Palomero de Jalisco	1	156	5.03	0	93.55	0.639
Serrano de Jalisco	2	202	6.52	1	93.55	0.565
Tablilla de Ocho	7	336	10.84	6	86.63	0.652
Zamorano Amarillo	7	325	10.50	5	81.57	0.621
Teocintle Chalco	1	220	7.10	13	100.00	0.643
Teocintle Balsas	1	163	5.26	6	100.00	0.731
Total	89	646	20.81	127	92.51	0.746

^y He: Índice de heterocigosidad esperada

Los loci con mayor número de alelos fueron *phi96100*, *phi015*, *phi402893* y *phi064* y aquellos con menor número de alelos corresponden a los marcadores *phi115* y *phi213398* (Figura 2.1). Matsuoka *et al.* (2002) mencionan que la variación en el tamaño de los SSR se ve reflejada en el número de alelos y que dicha variación se debe a mutaciones complejas en las regiones que flaquean estos marcadores. De los 646 alelos, 200 alelos (30.95%) presentan diferencias altamente significativas ($\alpha = 0.05$) entre las 89 poblaciones en estudio; estos alelos fueron empleados para construir las matrices de datos del ACP y análisis de conglomerados. Las razas de maíz con menor número de AL son las que están representadas con una o muy pocas accesiones (Palomero de Jalisco, Serrano de Jalisco y los teocintles raza Chalco y Balsas); por el contrario, la raza que mostró mayor número de AL es aquella que estuvo representada por el mayor número de accesiones (Elotes Occidentales), lo que indica mayor variación (Cuadro 2.2). Es decir, el tamaño de muestra influye en el número de alelos, debido a que es común que haya muchos alelos de baja frecuencia y el número de alelos observados se incrementa conforme aumenta el tamaño de muestra. Al respecto, Sánchez *et al.* (2000) en un estudio de diversidad genética en razas de maíz con isoenzimas y caracteres morfológicos, mencionan que los valores de la estimación de diversidad genética son afectados por el número de poblaciones en cada raza lo que incrementa el número de alelos nulos y de baja frecuencia entre las poblaciones.

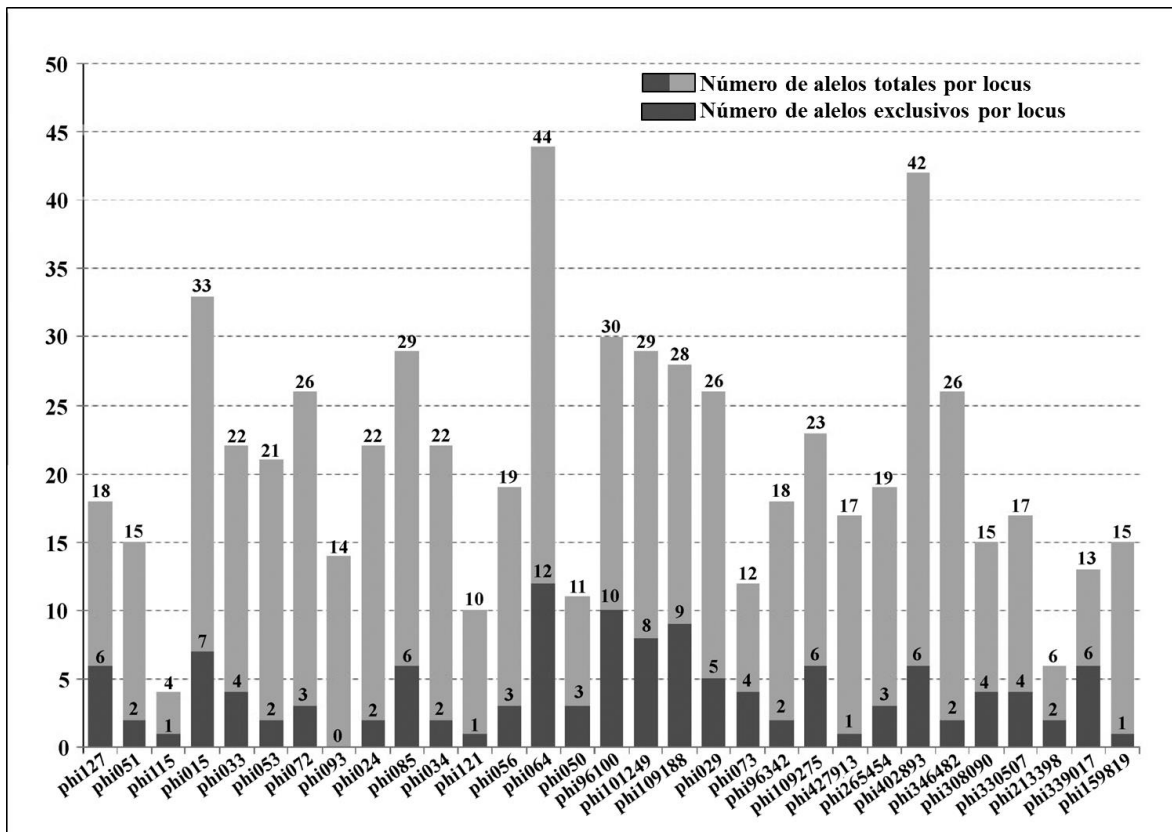


Figura 2.1. Número de alelos totales por *locus* y número de alelos exclusivos, para cada uno de los 31 marcadores SSR, obtenidos del análisis en 89 poblaciones mexicanas pertenecientes a diez razas de maíz y dos teocintles.

Del total de los 646 alelos, sólo 127 (19.66 %) son alelos específicos o exclusivos (AE), con frecuencias alélicas entre 0.020 y 0.729 y con distribución en 30 de los 31 *loci* SSR. Las razas que presentaron mayor número de AE fueron Elotes Occidentales y Celaya (Cuadro 2.2), lo que indica un nivel alto de diversidad molecular, posiblemente debido a altas tasas de mutación, que favorece la presencia de nuevos alelos como lo indica Wilkes (1977). Los marcadores que presentan mayor número de AE en las poblaciones de maíz fueron *phi064*, *phi96100*, *phi109188*, *phi101249*, *phi015*; el único *locus* que no presentó AE fue el *phi093* (Figura 2.1). Palomero de Jalisco y Serrano de Jalisco (representado por una y dos poblaciones, respectivamente) presentaron nulo o muy bajo número de AE (Cuadro 2.2). Hamblin *et al.* (2007) mencionan que la presencia de alelos SSR exclusivos en un individuo o población es un indicador de la presencia única de variación funcional del marcador, en estudios de diversidad genética en maíz.

La proporción de *loci* polimórfico (PLP) tuvo un promedio a nivel de raza de 92.51%; el valor más bajo (74.84%) se presentó en la raza Celaya, mientras que el más alto (100%) correspondió a los teocintles (Cuadro 2.2). Al respecto, Hamblin *et al.* (2007) mencionan que los SSR, cuando presentan valores altamente polimórficos, proporcionan mayor resolución en la medición de distancias genéticas y apoyan en la relación entre poblaciones de maíz mejor que otros marcadores moleculares.

La diversidad génica, también referida como H_e , a través de los marcadores varía de 0.512 a 0.734 entre accesiones (datos no mostrados); sin embargo, en los promedios por raza de maíz sin considerar a los teocintles, el valor más bajo (0.565) se presentó en las dos poblaciones de Serrano de Jalisco y el valor más alto (0.679) en la raza Celaya; este índice revela amplia diversidad dentro de población o accesión, entre accesiones y entre razas de maíz; los valores altos representan poblaciones más diversas o diferentes entre sí, y valores bajos representan poblaciones similares. El valor global obtenido para H_e en este estudio fue de 0.746, que representa alta diversidad genética (Cuadro 2.2). Las razas Dulce y Serrano de Jalisco presentaron los valores más bajos de H_e (0.595 y 0.565, respectivamente). Sánchez *et al.* (2000) mencionan que valores bajos de H_e en accesiones de maíz se asocian con las variantes de usos especiales, que se siembran en campos pequeños, y la semilla para el siguiente ciclo generalmente proviene de un pequeño número de mazorcas, como es el caso de estas dos razas. Estos mismos autores reportan un valor promedio de diversidad génica de 0.212 e indican que valores bajos de diversidad están presentes en las poblaciones de maíz que estudiaron y que dichos valores son muy similares a los que se encuentran en cultivos de autopolinización. Por otro lado, Matsuoka *et al.* (2002) reportan valores de diversidad genética en razas de maíz y teocintle, valorados por SSR, muy parecidos a los encontrados en este trabajo (promedio $H_e = 0.73$) y deducen que los *loci* SSR son menos variables en maíz que en teocintles, por los valores de diversidad que reportan, para cada subespecie (0.61 y 0.69, respectivamente).

5.2. Diferenciación genética

Los valores de F_{IS} variaron de 0.096 a 0.192 para las razas cultivadas de maíz, mientras que para las razas de teocintle estos fueron de 0.316 para la raza Balsas y 0.381 para la raza

Chalco; estos valores reflejan una deficiencia de heterocigotos y un cambio aleatorio en la frecuencia de alelos de una generación a otra con cierto grado de fijación de homocigotos en las poblaciones, lo que manifiesta deriva génica en las poblaciones, ya que dicho fenómeno tiende a formar poblaciones homocigóticas, es decir que tiende a eliminar los genotipos heterocigóticos; además, la deriva génica hace que dos o más poblaciones de la misma especie tiendan a diferenciarse genéticamente (Klug *et al.*, 2006), efecto que es mayor en las razas de teocintle de este estudio (Cuadro 2.3). Labate *et al.* (2003) reportaron una F_{IS} de 0.096, lo que concuerda con los resultados del presente estudio y que indica una tendencia en la pérdida de alelos menos frecuentes (heterocigotos) y una fijación de los más frecuentes (homocigotos) en poblaciones que se encuentran resguardadas en bancos de germoplasma. El *locus* SSR que menos favoreció los efectos endogámicos dentro de las poblaciones fue *phi402893* con un valor de $F_{IS} = -0.009$, con un ligero exceso de heterocigotos, mientras que el más tendiente a la endogamia fue *phi2113398* ($F_{IS} = 0.609$), lo que manifiesta que hubo poblaciones con más heterocigotos con el primer marcador que con el segundo, respectivamente. Doebley (2004) encontró poblaciones aisladas de tamaño variable de teocintles, este aislamiento en campo puede explicar la endogamia de estas dos poblaciones; Eguiarte *et al.* (2013) en otro estudio hallaron una relación entre la endogamia en teocintles y la perturbación de los paisajes donde crecen en forma natural, reportaron mayor endogamia cuando la población está más aislada.

Cuadro 2.3. Estadísticos F y flujo génico calculado a partir de 31 *loci* de microsatélites para 10 razas mexicanas de maíz y dos teocintles.

Raza	F_{IS} [§]	F_{ST} [¶]	F_{IT} [¥]
Bofo	0.160	0.306	0.174
Celaya	0.142	0.462	0.373
Coscomatepec	0.131	0.291	0.184
Dulce	0.192	0.379	0.232
Elotes Occidentales	0.143	0.298	0.181
Mushito	0.158	0.253	0.113
Palomero de Jalisco	0.130	0.130	-
Serrano de Jalisco	0.154	0.314	0.189
Tablilla de Ocho	0.117	0.300	0.207
Zamorano Amarillo	0.096	0.373	0.306
Chalco	0.381	0.381	-
Balsas	0.316	0.316	-
Global	0.149	0.380	0.271

[§]Endogamia dentro de poblaciones; [¶]Endogamia entre poblaciones; [¥]Endogamia dentro de la población entera.

Los valores de F_{ST} variaron entre 0.130 y 0.462 en las razas Palomero de Jalisco y Celaya, respectivamente, con un promedio de 0.380 (Cuadro 2.3). A mayor valor, mayor es la diferencia entre las poblaciones de cada raza de maíz, por lo que estos resultados muestran que las poblaciones están diferenciadas y tienden a presentar flujo genético reducido entre las poblaciones de cada grupo, ya que 72% de esta diversidad total se debe a la variación genética entre los individuos dentro de cada población y sólo el 38% de la variación genética se debe a variación entre las poblaciones. Zerjal *et al.* (2012) encontraron valores de F_{ST} grandes (0.31) con SSR en variedades locales de maíz originarias de Estados Unidos, lo que indica alta diferenciación entre las poblaciones; mientras que Labate *et al.* (2003) reportan valores de F_{ST} de 0.14 a 0.16 para poblaciones de maíz de la Faja Maicera de los Estados Unidos, y señala que 85% de la variación genética molecular total es compartida entre ellas, lo que es muy similar al apareamiento aleatorio de esta especie.

Dada la naturaleza del maíz de ser una planta de polinización abierta expuesta al cruzamiento, Salhuana *et al.* (1998) mencionan que algunas colectas realizadas en maíz presentan un importante nivel de diversidad genética, representada por altos valores de heterocigosidad; sin embargo, los valores de F_{IS} y F_{IT} que se presentan en este estudio (0.149 y 0.271, respectivamente) indican lo contrario; es decir, un alejamiento del equilibrio global de Hardy-Weinberg hacia una deficiencia de heterocigotos, debido principalmente a la existencia de una estructura genética explicada por el patrón racial de las poblaciones; además, también puede contribuir el origen de las semillas utilizadas para este estudio, las cuales proviene de colectas almacenadas en los bancos de germoplasma desde los años 1940s y 1950s y en prácticamente todos los casos han pasado por un proceso de regeneración en forma aislada fuera de su ambiente (Kato *et al.*, 2009), reduciendo sus posibilidades de adaptación, y son frecuentes las restricciones en el tamaño de la población, acelerando la recombinación entre individuos emparentados dentro de las propias poblaciones y propicia el fenómeno de deriva genética y endogamia con la pérdida de variabilidad genética (Doebley *et al.*, 1985).

5.3. Interrelaciones raciales

El ACP a partir de las frecuencias de los alelos con diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre los 12 grupos genéticos de maíz (200 alelos), indicó que la varianza total acumulada mayor a 50% se explica con los primeros 10 componentes principales (CP) y los cuatro primeros contribuyen con 35.64% (Cuadro 2.4). La baja aportación de la varianza acumulada de los primeros CP, es común que se presente en estudios de marcadores moleculares; en maíz, Matsuoka *et al.* (2002) obtienen 6.1% del total de la varianza acumulada en los CP1 y CP2 utilizando 99 microsatélites, por otro lado, Reif *et al.* (2006) reportan 28.6% usando 25 microsatélites; resultados contrastantes a los obtenidos con datos morfológicos, en los que se obtienen valores mucho mayores como los encontrados por Beyene *et al.* (2005) de 54.61% y por Rodríguez-Pérez *et al.* (2012) de 39.42% de la varianza acumulada con los dos primeros CP.

Cuadro 2.4. Primeros 10 componentes principales (CP) y porcentaje de la varianza acumulada para 87 poblaciones de diez razas de maíz y dos de teocintle a partir de 31 loci de microsatélites.

CP	Valor propio	Porcentaje de la varianza explicada	Porcentaje de la varianza acumulada
1	30.900	15.45	15.45
2	19.988	9.99	25.44
3	10.760	5.38	30.82
4	9.629	4.81	35.64
5	7.734	3.87	39.51
6	6.866	3.43	42.94
7	6.525	3.26	46.20
8	5.320	2.66	48.86
9	5.092	2.55	51.41
10	4.511	2.26	53.66

La representación gráfica de las accesiones con base en gráficos bidimensionales de los primeros CP no generó una agrupación muy clara entre las poblaciones, debido posiblemente a que dichos CP recogen poca varianza acumulada (Cuadro 2.4). Al respecto, Reif *et al.* (2006) señalan que la falta de diferenciación de grupos en poblaciones de maíz puede deberse a un problema fundamental de no saber cuántos grupos generar, probablemente por la cercanía entre poblaciones; también mencionan que esto sucede cuando existe tendencia a un exceso de homocigosis en la mayoría de los loci en las accesiones, como en este caso (Cuadro 2.3). Un

exceso de homocigosis podría dar lugar a una sobreestimación del número de agrupaciones o la falta de diferencias entre grupos (Reif *et al.*, 2005); a esto se suma que un flujo genético continuo entre razas no permite ubicar a las poblaciones en grupos bien definidos a nivel molecular, a pesar de que morfológicamente puede existir cierta homogeneidad debido a selección hacia las características que son de interés para los agricultores (Pressoir y Berthaud, 2004; Reif *et al.*, 2006).

Mediante un diagrama de dispersión en tercera dimensión con CP1, CP2 y CP4 fue posible apreciar la distribución de las poblaciones agrupadas en tres estratos (Figura 2.2). El primer estrato agrupa a la mayoría de las poblaciones de las razas Bofo (88% de las poblaciones), Dulce (67%), Elotes Occidentales (35%) y una accesión de la raza Coscomatepec (14%); este estrato se caracteriza por presentar poblaciones que fueron colectadas en estados del norte del país como Durango, Zacatecas, Nayarit, Jalisco y Sinaloa. El segundo estrato integra poblaciones de ocho de las diez razas de maíz en estudio: Zamorano Amarillo (100%), Celaya (73%), Tablilla de Ocho (71%), Elotes Occidentales (65%), Dulce (25%) y una accesión de las razas Bofo, Mushito y Palomero de Jalisco, 12, 20 y 100%, respectivamente. La mayoría de estas poblaciones fueron colectadas en los estados de Jalisco, Guanajuato, Michoacán y un grupo muy homogéneo en el estado de Guerrero (Elotes Occidentales). El tercer estrato lo integran poblaciones de las razas Coscomatepec (86%), Mushito (80%), Tablilla de Ocho (29%), Celaya (27%) y una población de Dulce (8%), provenientes de los estados de Michoacán, Puebla y Veracruz. La raza Serrano de Jalisco se ubicó en los límites superior e inferior de los tres estratos. Las dos poblaciones de teocintle (raza Chalco y Balsas) se ubicaron claramente distantes al resto de las accesiones de maíz, lo que corrobora que se trata de subespecies distintas al maíz cultivado (Figura 2.2). En general, estos resultados indican que existe un continuo en las poblaciones de las razas de maíz formando complejos raciales que no se ajustan de manera estricta a la distribución geográfica o a las condiciones ecológicas en las que se ha ubicado a las razas en el país. Un estudio genético basado en marcadores neutros demuestra que las razas se organizan en un continuo y en su evolución está involucrado el aislamiento geográfico (Pressoir y Berthaud, 2004).

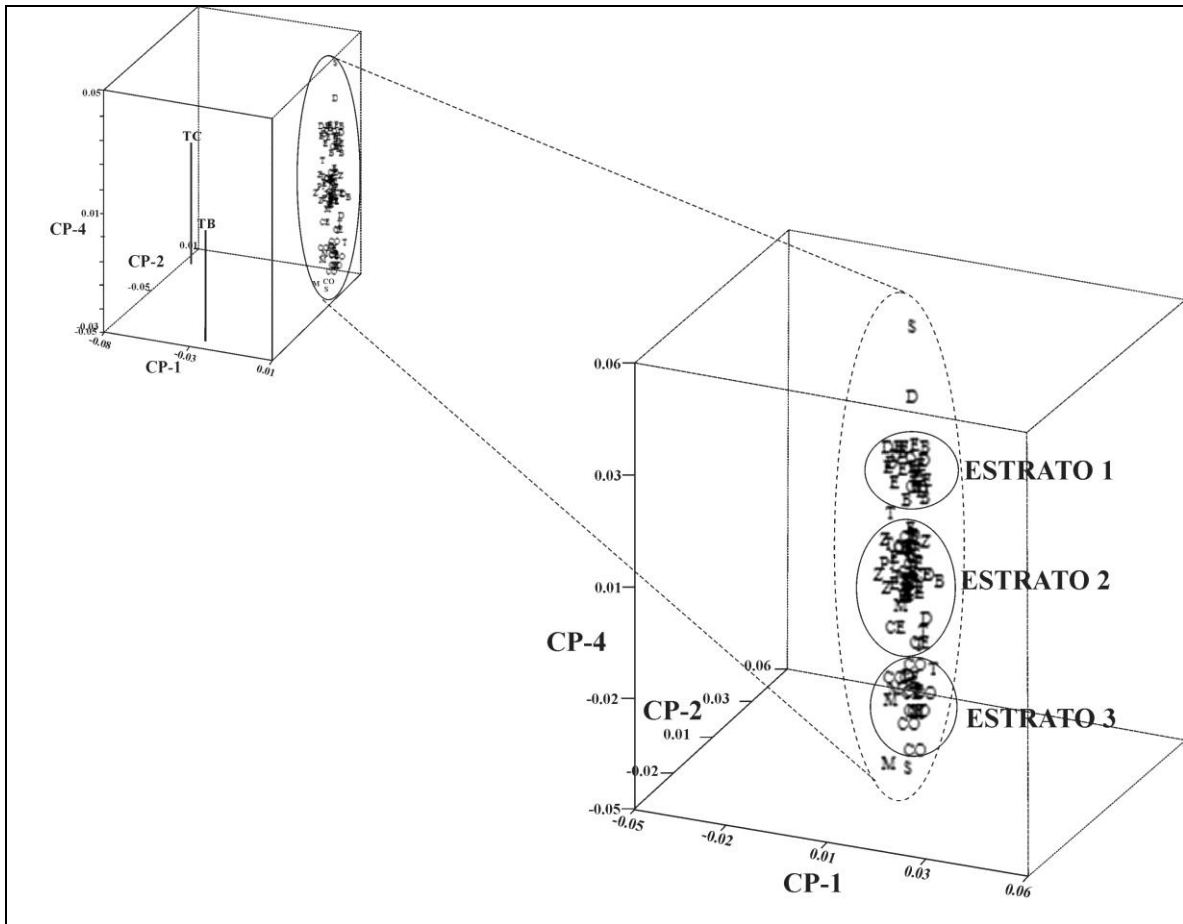


Figura 2.2. Diagrama de dispersión de 89 poblaciones representativas de 10 razas mexicanas de maíz y dos razas de teocintles con base en los componentes principales CP1, CP2 y CP4. TC= teocintle raza Chalco, TB= teocintle raza Balsas, B= Bofo, CE= Celaya, CO= Coscomatepec, D= Dulce, E= Elotes Occidentales, M= Mushito, P= Palomero de Jalisco, S= Serrano de Jalisco, T= Tablilla de Ocho, Z= Zamorano Amarillo.

Los alelos que más contribuyeron a la dispersión de las accesiones para formar los estratos en el CP1 fueron 13 (*phi029-Q*, *phi033-V*, *phi050-F*, *phi064-W*, *phi072-J*, *phi072-V*, *phi096100-Z*, *phi096100-b*, *phi109275-U*, *phi109275-V*, *phi109275-W*, *phi127-J*, y *phi330507-G*); mientras que en el CP2, nueve alelos tuvieron la mayor participación en su definición (*phi015-B*, *phi034-V*, *phi064-H*, *phi073-K*, *phi093-A*, *phi109188-C*, *phi109188-D*, *phi127-D* y *phi96342-O*), mientras que para el caso del CP4 se reduce a siete el número de alelos con participación significativa (*phi034-D*, *phi085-O*, *phi121-A*, *phi127-A*, *phi213398-E*, *phi213398-F* y *phi346482-A*). Pejic *et al.* (1998), mencionan que la elección no arbitraria de un número significativo de secuencias SSR, permite obtener una identificación del individuo por la

comparación de patrones alélicos, y de esta forma establecer grupos de individuos con características génicas similares.

El árbol filogenético generado con los 200 alelos seleccionados reveló la presencia de cinco grupos raciales (Figura 2.3), el Grupo 1 integra en su mayoría a accesiones de la raza Bofo (75%). El Grupo 2 forma dos subgrupos bien diferenciados, el primero de ellos (2.1) es heterogéneo constituido por accesiones de seis de las diez razas en estudio (Bofo 12.5%, Celaya 33.3%, Coscomatepec 28.57%, Dulce 8.33%, Mushito 80% y Tablilla de Ocho 57.14%); sin embargo, el segundo subgrupo (2.2) agrupa poblaciones de la raza Elotes Occidentales (57%), que fueron colectadas en el estado de Guerrero, el cual ha sido consistente en el ACP (Figura 2.2) y en los análisis morfológicos (datos no mostrados). Este mismo subgrupo (2.2) contempla en una rama externa dos poblaciones de la raza Dulce. Los Grupos 3 y 4 son pequeños, con poblaciones de las razas Coscomatepec y Zamorano Amarillo (3 poblaciones, 42.8%, en cada caso) para el Grupo 3, y Coscomatepec (14.2%), Mushito (20%), Serrano de Jalisco (50%) y Zamorano Amarillo (14.2%), representadas con una población de cada raza, para el Grupo 4. En el Grupo 5 es posible diferenciar dos subgrupos, el 5.1 que integra accesiones de la raza Celaya (60%) y Zamorano Amarillo (28.5%) y el 5.2 con accesiones de las razas Elotes Occidentales (8.6%), Tablilla de Ocho (42.8%) y Zamorano Amarillo (14.2%). En este análisis no es clara la continuidad de las razas por un patrón de distribución geográfico como se encontró en el ACP, y como lo mencionan Sánchez *et al.* (2000), que la variación isoenzimática y morfológica en razas mexicanas de maíz no se distribuye al azar, sino que se asocia a ciertas condiciones ecológicas, inherentes a cada población y raza. Matsuoka *et al.* (2002) resaltan la utilidad de los microsatélites en el estudio de la diversidad genética en maíz, puesto que han resultado ser excelentes en la búsqueda de fuentes de variación intraespecífica.

El teocintle de la raza Chalco fue considerado como un grupo externo, y el filograma coloca al de la raza Balsas, como antecesor inmediato del maíz, sirviendo de puente genético entre la raza Chalco de teocintle y las poblaciones de maíz cultivado. De los diversos estudios realizados para dilucidar la participación del teocintle en el origen del maíz, se ha concluido que la variante de teocintle más cercana al maíz cultivado es el *Zea mays* ssp. *parviglumis*, que corresponde a la raza Balsas (Doebley, 1990; Matsuoka *et al.*, 2002).

En el árbol filogenético (Figura 2.3) se aprecian en la parte inferior cuatro accesiones, tres de Dulce y una de Elotes Occidentales, que no se integraron a ninguno de los cinco grupos identificados, estas poblaciones se encuentran más cercanas genéticamente a la raza Balsas de teocintle, al igual que el Grupo 1. El Subgrupo 5.1 resultó ser el más alejado con respecto al resto de los otros grupos e incluso a la accesión de teocintle de la raza Balsas, en este subgrupo predomina la raza Celaya, Wellhausen *et al.* (1951), ubicó a esta raza dentro del grupo de las Modernas Incipientes y al igual que en este caso, con los estudios de Sánchez *et al.* (2000), se confirma que ésta es una raza reciente. En este mismo contexto, las accesiones de la raza Serrano de Jalisco (Jali-146 y Jali-162) resultaron ser poblaciones con mayor diferenciación filogenética, con respecto al resto de las poblaciones, de lo que se infiere que pudiera deberse a poblaciones no definidas, debido a la poca información que aportó por tratarse de pocas accesiones, resultados que concuerdan con los de Wellhausen *et al.* (1951). Sánchez *et al.* (2000) quienes reportan que la raza Serrano de Jalisco fue la que mayor número de alelos isoenzimáticos presentó respecto al resto de las razas, esto puede explicar su comportamiento en el filograma y ACP; sin embargo, el valor fue bajo en este estudio (Cuadro 2.2). Los resultados revelan que las razas de maíz comparten un origen en común y se relacionan entre ellas sobre la base de marcadores estables y neutros como los SSR, los cuales proporcionan información útil dentro de un esquema filogenético, al igual que lo mencionó con anterioridad Matsuoka *et al.* (2002) y que pueden tomarse en cuenta al momento de plantear esquemas de mejoramiento genético.

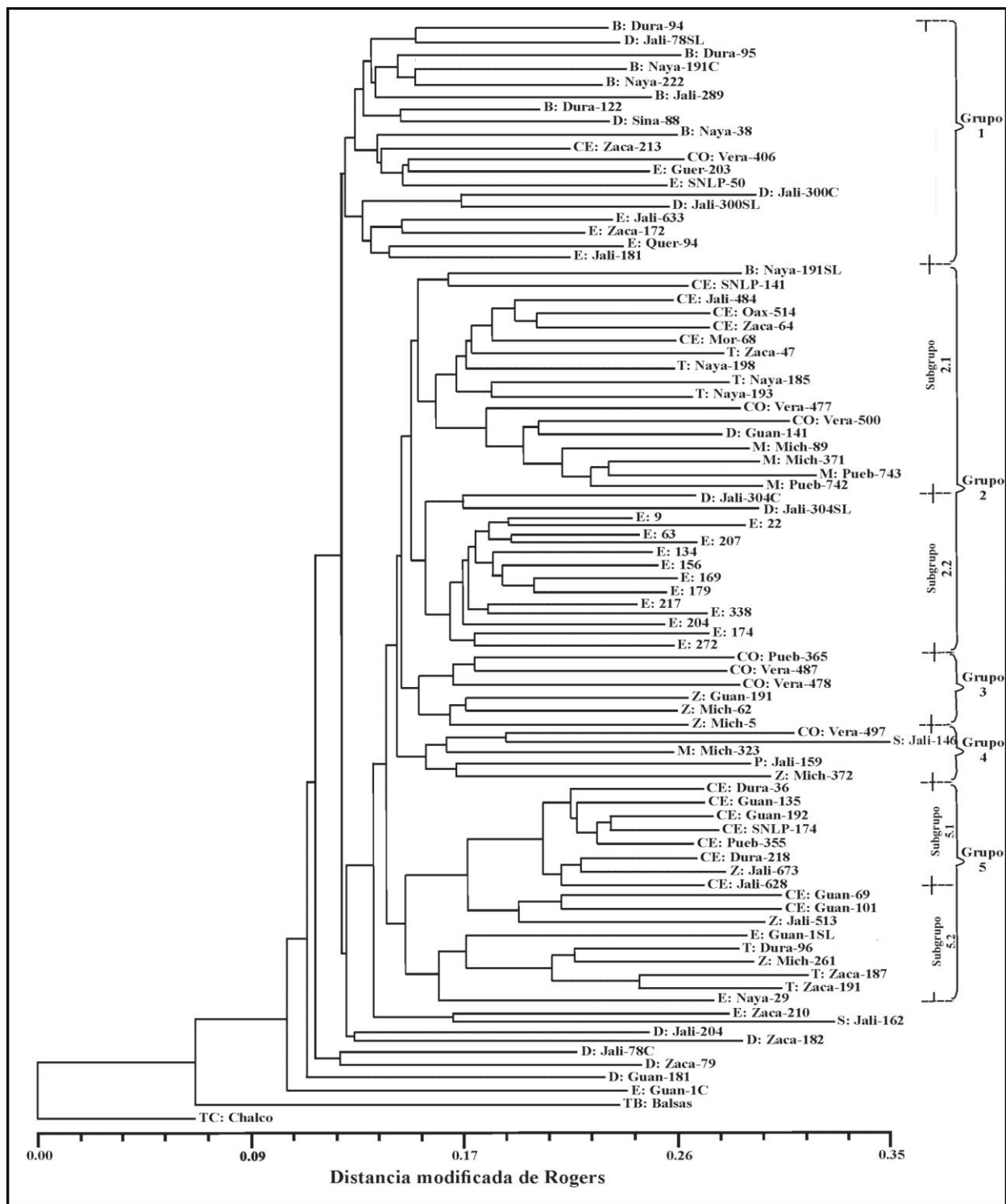


Figura 2.3. Árbol filogenético generado con distancias genéticas modificadas de Rogers con base en 200 alelos SSR, con el método de agrupamiento de Neighbor-Joining. TC= teocintle raza Chalco, TB= teocintle raza Balsas, B= Bofo, CE= Celaya, CO= Coscomatepec, D= Dulce, E= Elotes Occidentales, M= Mushito, P= Palomero de Jalisco, S= Serrano de Jalisco, T= Tablilla de Ocho, Z= Zamorano Amarillo.

6. CONCLUSIONES

Existe un alto grado de diversidad a nivel molecular en las poblaciones estudiadas, reflejada con la presencia de 646 alelos totales, con una frecuencia de 19.66% de alelos exclusivos, y un promedio de 20.81 alelos por *locus* y un valor de heterocigosidad esperada de 0.764. Las razas Serrano de Jalisco y Dulce fueron menos diversas entre poblaciones pues presentaron una H_e de 0.565 y 0.595, respectivamente; mientras que las razas Balsas de teocintle y Celaya de maíz presentaron la mayor heterocigosidad (0.731 y 0.679, respectivamente). Existe una deficiencia de heterocigotos entre las poblaciones y entre las razas lo que indica cambios en las frecuencias alélicas favoreciendo o fijando a las poblaciones de maíz en estudio a ser homocigóticas; la estructura genética de las poblaciones señala que un 72% de la variación reside entre individuos dentro de las poblaciones. Las poblaciones se agrupan en tres estratos, que presentan un continuo dentro y entre las razas de maíz formando complejos sin una estricta relación con la estructura de las razas descritas de manera tradicional; filogenéticamente, las poblaciones de las razas de maíz estudiadas comparten un origen en común y relación entre ellas sobre la base de marcadores estables y neutros, como los SSR.

7. LITERATURA CITADA

- Applied Biosystems (2005)** GeneMapper[®] Software Version 4.0. Reference and Troubleshooting Guide. Applied Biosystems Inc. Foster City, CA. 82 p.
- Becher S A, K Steinmetz, K Weising, S Boury, D Peltier, J-P Renou, G Kahl, K Wolff (2000)** Microsatellites for cultivar identification in *Pelargonium*. Theoretical and Applied Genetics 101: 643-651.
- Beyene Y, A M Botha, A A Myburg (2005)** A comparative study of molecular and morphological methods of describing genetic relationships in traditional Ethiopian highland maize. African Journal of Biotechnology 4: 586-595.
- Doebley J (1990)** Molecular evidence and the evolution of maize. Economic Botany 44(3 Supplement): 6-27.
- Doebley J (2004)** The genetics of maize evolution. Annual Review Genetic 38: 37-59.
- Doebley J F, M M Goodman, C W Stuber (1984)** Isoenzymatic variation in *Zea* (Gramineae).

- Systematic Botany 9: 203-218.
- Doebley J F, M M Goodman, C W Stuber (1985)** Isozyme variation in the races of maize from Mexico. *American Journal of Botany* 72: 629-639.
- Eguiarte L E, J A Aguirre-Liguori, L Jardón-Barbolla, E Aguirre-Planter, V Souza (2013)** Genómica de poblaciones: nada en evolución va a tener sentido si no es a la luz de la genómica, y nada en genómica tendrá sentido si no es a la luz de la evolución. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 16: 42-56.
- Goodman M M, E Paterniani (1969)** The races of maize: III. Choices of appropriate characters for racial classification. *Economic Botany* 23: 265-273.
- Hamblin T M, M L Warburton, E S Buckler (2007)** Empirical comparison of simple sequence repeats and single nucleotide polymorphisms in assessment of maize diversity and relatedness. *PLoS ONE* 2(12): e1367. doi: 10.1371/journal.pone.0001367.
- Kato Y T A, C Mapes S, L M Mera O, J A Serratos H, R A Bye B (2009)** Origen y Diversificación del Maíz. Una Revisión Analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D. F. 115 p.
- Klug W S, M R Cummings, C A Spencer (2006)** Conceptos de Genética. 8a ed. Pearson/Prentice Hall. Madrid, Esp. 239 p.
- Labate J A, K R Lamkey, S E Mitchell, S Kresovich, H Sullivan, J S C Smith (2003)** Molecular and historical aspects of Corn Belt Dent diversity. *Crop Science* 43: 80-91.
- Lee J M, S H Nahm, Y M Kim, B D Kim (2004)** Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite *loci* in pepper. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 619-627.
- López R G, A Santacruz V, A Muñoz O, F Castillo G, L Córdova T, H Vaquera H (2009)** Perfil isoenzimático de maíces nativos del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, México. II. Variación dentro de grupos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32: 177-188.
- Matsuoka Y, Y Vigouroux, M M Goodman, J Sánchez G, 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.
- Pejic I, P Ajmone-Marsan, M Morgante, V Kozumplik, P Castiglioni, G Taramino, M Motto (1998)** Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 1248-1255.

- Pressoir G, J Berthaud (2004)** Population structure and strong divergent selection shape phenotypic diversification in maize landraces. *Heredity* 92: 95-101.
- Rajwant K K, K R Manoj, K Sanjay, S Rohtas, A K Dhawan (2011)** Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177: 309-334.
- Reif J C, S Hamrit, M Heckenberger, W Schipprack, H P Maurer, M Bohn, A E Melchinger (2005)** Genetic structure and diversity of European flint maize populations determined with SSR analyses of individuals and bulks. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 906-913.
- Reif J C, M L Warburton, X C Xia, D A Hoisington, J Crossa, S Taba, M Muminović, M Bohn, M Frisch, A E Melchinger (2006)** Grouping of accessions of Mexican races of maize revisited with SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 177-185.
- Rodríguez-Pérez G, F Zavala-García, C Ojeda-Zacarías, A Gutiérrez-Diez, J E Treviño-Ramírez, F Rincón-Sánchez (2012)** Diversidad de maíces criollos de Nuevo León, México, mediante AFLP y caracteres morfológicos. *Agronomía Mesoamericana* 23: 569-583.
- Rohlf F J (2009)** NTSYSpc: numerical taxonomy system. Version 2.21h. Exeter Software: Setauket: New York.
- Saitou N, M Nei (1987)** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Salhuana W, L M Pollak, M Ferrer, O Paratori, G Vivo (1998)** Breeding potential of maize accessions from Argentina, Chile, U.S.A. and Uruguay. *Crop Science* 38: 866-872.
- Sánchez G J J, M M Goodman, J O Rawlings (1993)** Appropriate characters for racial classification in maize. *Economic Botany* 47: 44-59.
- Sánchez G J J, M M Goodman, C W Stuber (2000)** Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Economic Botany* 54: 43-59.
- Santacruz-Varela A, M P Widrlechner, K E Ziegler, R J Salvador, M J Millard, P K Betting (2004)** Phylogenetic relationships among North American popcorns and their evolutionary links to Mexican and South American popcorns. *Crop Science* 44: 1456-1467.
- SAS Institute (2002)** The SAS[®] System for Windows[®] (Version 9.3). Statistical Analysis System Institute Inc. Cary, N.C., U.S.A. 4424 p.

- Valadez M E, G Kahl (2005)** Huellas de ADN en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Editorial. Mundi-Prensa. México, D. F. 147 p.
- Wellhausen E J, L M Roberts, E Hernández X (en colaboración con 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.
- Wietholter P, M J Cruz de Melo S, T de Freitas T, S Delmar dos Anjos e S, J F Barbosa N (2008)** Genetic variability in corn landraces from Southern Brazil. *Maydica* 53: 151-159.
- Wilkes H G (1977)** Hybridization of maize and teosinte, in Mexico and Guatemala and the improvement of maize. *Economic Botany* 31: 254-293.
- Wright S (1978)** Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4. Variability within and among Natural Populations. University of Chicago Press. Chicago, IL, U.S.A. 590 p.
- Yeh F C, R-C Yang, T Boyle (1999)** POPGENE Version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide. University of Alberta and Centre for International Forestry Research. Edmonton, Canada. 28 p.
- Zerjal T, A Rousselet, C Mhiri, V Combes, D Madur, M A Grandbastien, A Charcosset, M I Tenailon (2012)** Maize genetic diversity and association mapping using transposable element insertion polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics* 124: 1521-1537.

CAPÍTULO III
RELACIONES ENTRE RAZAS MEXICANAS DE MAÍZ DE ALTITUDES
INTERMEDIAS POR MEDIO DE ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y MOLECULAR
COMBINADO

1. RESUMEN

Los análisis en forma conjunta de datos diferentes como morfológicos y moleculares han favorecido de forma directa el entendimiento de las interrelaciones raciales en maíz. Se estudiaron 87 poblaciones de diez razas mexicanas de maíz, para determinar las relaciones raciales y conocer la diversidad genética interpoblacional e intrapoblacional mediante un análisis simultáneo de datos 16 variables morfológicas y 200 alelos SSR. Se realizó análisis de componentes principales (ACP), donde los primeros 16 CP explican poco más del 50% de la varianza total, mientras que CP1 y CP2 se explican más del 13%. Fueron 20 las variables que mayormente contribuyeron en la dispersión de las poblaciones (60% morfológicas y 40% de SSR). Este análisis permitió visualizar cinco grupos y dos asociaciones entre las poblaciones, las cuales se relacionan en un 74% con las agrupaciones formadas en el análisis de conglomerados, representado en un árbol no jerárquico que se realizó con las distancias genéticas de Gower para datos combinados y por el método de agrupamiento Neighbor-Joining. Las relaciones filogenéticas se representaron en cuatro grupos que definieron a las poblaciones por la raza a la que pertenecen en forma original y corroboraron la clasificación que se tiene en los bancos de germoplasma; estas relaciones explican la intervención de los marcadores moleculares del tipo SSR y morfológicos, con alta capacidad discriminadora para cada población en grupos y subgrupos específicos para ocho de las diez razas en estudio (Bofo, Celaya, Coscomatepec, Dulce, Elotes Occidentales, Mushito, Tablilla de Ocho y Zamorano Amarillo). Se detectó amplia variabilidad genética intra e inter-racial. Con una prueba de Mantel se determinó el grado de concordancia de los datos moleculares SSR y morfológicos con los datos combinados y se encontró congruencia entre distancias genéticas de 63% y 77% respectivamente.

Palabras clave: *Zea mays* L., caracteres morfológicos, SSR, diversidad genética, interrelaciones raciales, Gower.

RELATIONSHIPS BETWEEN MEXICAN MAIZE RACES FROM INTERMEDIATE ALTITUDES THROUGH MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR COMBINED ANALYSIS

2. SUMMARY

Joint analyses of different data such as morphological and molecular information have directly favored the understanding of the racial relationships in maize. In order to determine racial relationships and to know the inter and intra-population genetic diversity, 87 populations of ten races of Mexican maize were studied by simultaneous data analysis of 16 morphological traits and 200 simple sequence repeat (SSR) alleles. Principal component analysis (PCA) was performed, where the first 16 PC explain over 50% of the total variance, while PC1 and PC2 explain more than 13%. Twenty variables predominantly contributed to the dispersal of populations (60% morphological and 40% SSR). This analysis allowed visualization of five groups and two associations among the populations, which are related by 74% with groups formed by cluster analysis, represented through a non-hierarchical tree constructed with Gower's genetic distances from combined data using the Neighbor-Joining method. Phylogenetic relationships were represented in four groups, which defined populations by their original race and confirmed the classification as recorded in the germplasm banks; these relationships explain the intervention of SSR and morphological markers, with high discriminatory capacity for each population into groups and subgroups specific for eight of the ten races under study (Bofo, Celaya, Coscomatepec, Dulce, Elotes Occidentales, Mushito, Tablilla de Ocho, and Zamorano Amarillo). Large intra- and inter-racial genetic variability was detected. The degree of concordance of SSR and morphological data with the combined data through a Mantel test and congruence of 63% and 77% between genetic distances was found respectively.

Index words: *Zea mays* L., morphological characters, SSR, genetic diversity, racial relationships, Gower.

3. INTRODUCCIÓN

El maíz es uno de los cultivos con mayor importancia nacional e internacional y es una de las especies con mayor diversidad genética en el mundo; a diferencia de los otros cereales, se puede cultivar en casi todos los climas, altitudes y tipos de suelos. La importancia en el estudio de la diversidad genética de esta especie radica en que con ésta se han integrado los programas de mejoramiento genético para la obtención de variedades mejoradas e híbridos de alto rendimiento. Además, el cultivo de poblaciones nativas de maíz se practica por más de dos millones de agricultores en prácticamente todo el territorio mexicano; de ahí, es también sustento importante en el mismo número de hogares (Kato *et al.*, 2009).

La enorme capacidad del maíz para adaptarse tiene que ver con características fisiológicas de la planta, su diversificación en el proceso de domesticación y evolución bajo domesticación y con el conocimiento de los agricultores. Aunque el maíz es una especie, su diversidad genética es impresionante; para su valoración se han descrito un gran número de razas y variedades que presentan diferencias evidentes entre sí; los agricultores a través del tiempo han adaptado al maíz a las diferentes condiciones ecológicas y con ello modificado las expresiones de variabilidad. Tan sólo en México se han reconocido más de 60 complejos raciales y miles de variantes en la diversificación de las numerosas poblaciones que son testimonio de su amplia diversidad y distribución geográfica (Kato *et al.*, 2009).

Los estudios y exploraciones conducentes a clasificar la diversidad del maíz colectada en México y América han considerado un gran número de características morfológicas. Los primeros trabajos de clasificación se fundamentaron en la definición de las razas sobre bases morfológicas, fisiológicas, genéticas, agronómicas y características citogenéticas, y permitieron establecer patrones de variación (Anderson y Cutler, 1942; Wellhausen *et al.* 1951). Esta información constituye la base del conocimiento de la diversidad de maíz y ha sido fundamental como patrón en la descripción de las razas. En las últimas décadas el empleo de marcadores bioquímicos y moleculares, ha permitido profundizar en la descripción y entendimiento de las interrelaciones entre los complejos raciales en maíz, y ha logrado conocer la diversidad genética de esta especie (Sánchez *et al.*, 2000; Matsuoka *et al.*, 2002).

Los análisis de caracteres morfológicos y moleculares en forma conjunta han favorecido directamente el estudio del maíz; teóricamente, la cantidad y calidad de información para su valoración son infinitos. Sánchez *et al.* (2000), en un estudio de las razas mexicanas de maíz, encontraron que la resolución de las relaciones entre grupos, al considerar en forma individual a caracteres morfológicos o polimorfismo de isoenzimas, son menos claras en comparación con la combinación de ambos tipos de información en forma conjunta; la resolución es mejor, y las variantes se ubican en grupos más consistentes.

Desde que la valoración molecular se incorporó a los análisis filogenéticos, ha existido un debate sobre si éstos o los morfológicos resultan mejores como fuente de información para estimar la filogenia y estudios de diversidad (Patterson *et al.*, 1993). De acuerdo con Moritz y Hillis (1996), los datos moleculares pueden auxiliar cuando la variación morfológica es limitada y la homología de los caracteres morfológicos no es clara. Estudios que incorporen a ambos pueden dar mejores descripciones e interrelaciones de la diversidad biológica que los que se enfoquen solamente en un tipo de caracteres.

Chippindale y Wiens (1994) mencionan que en los estudios de análisis combinado casi siempre se llevan a cabo análisis separados de los subconjuntos de información, además del análisis combinado; sin embargo, es inapropiado combinar conjuntos de datos en un sólo análisis si éstos resultan significativamente diferentes entre sí (Bull *et al.*, 1993); en tal caso, se prefiere un análisis separado de los subconjuntos de los datos disponibles y se permite la combinación de datos sólo si los resultados de estos análisis separados no están en conflicto (de Queiroz, 1993).

Con base en el contexto anterior y con la finalidad de establecer relaciones raciales congruentes entre 87 poblaciones de diez razas mexicanas de maíz de altitudes intermedias, así como conocer la diversidad genética interpoblacional e interracial de dichas poblaciones se llevó a cabo un análisis simultáneo de datos de carácter morfológico y molecular.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material genético

Se caracterizaron 87 poblaciones de maíz, pertenecientes a 10 razas mexicanas con adaptación a altitudes intermedias: Bofo (8 accesiones), Celaya (15), Coscomatepec (7), Dulce (12), Elotes Occidentales (23), Mushito (5), Palomero de Jalisco (1), Serrano de Jalisco (2), Tablilla de Ocho (7) y Zamorano Amarillo (7) y como referencia dos materiales mejorados recomendados en cada localidad (en valoración morfológica); también se consideró una accesión de la raza Palomero Toluqueño como grupo externo (en valoración del polimorfismo de SSR); la semilla se adquirió en los bancos de germoplasma del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, Universidad Autónoma Chapingo, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias y Colegio de Postgraduados.

4.2. Ubicación del experimento

El experimento se realizó en dos fases, una de campo (caracterización morfológica) y otra de laboratorio (caracterización molecular). En la primera se establecieron dos experimentos; el primero en el Campo Experimental del Instituto Tecnológico de Roque, Celaya, Guanajuato (20° 34' 55" LN, 100° 49' 33" LO, altitud de 1766 msnm) y el segundo en el Rancho los Paredones, Cd. Guzmán, Jalisco (19° 43' 09" LN, 103° 29' 57" LO, altitud de 1515 msnm). La segunda fase se realizó en los laboratorios referentes al proyecto "Huella Genética del Maíz", en el Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo.

4.3. Caracterización morfológica

La valoración morfológica consistió en el establecimiento de los experimentos mediante un diseño experimental en bloques incompletos 9 x 10, con dos repeticiones, conducido con riego en el ciclo primavera-verano 2010; se establecieron 88 poblaciones de maíz y como referencia dos materiales mejorados recomendados en cada localidad. Se midieron 30 variables mediante los procedimientos indicados por Sánchez *et al.* (1993), a partir de las cuales se seleccionaron 16

con base en su coeficiente de repetibilidad ($r \geq 3.0$): altura de planta (AP), ancho de la hoja de la mazorca (AHM), días a floración femenina (FF) y masculina (FM), longitud total de la espiga (LE) y del pedúnculo (LPE), longitud de la mazorca (LM), diámetro de la mazorca (DM) y del olote (DO), la relación LM/DM, número de hileras de granos de la mazorca (HM), ancho de grano (AG), longitud de grano (LG) espesor del grano (EG), la relación AG/LG, y el peso de 100 granos en gramos (P100G).

4.4. Caracterización molecular

La valoración del polimorfismo molecular de SSR consistió en la extracción de ADN de 87 poblaciones de maíz (25 plantas en forma individual de cada población) y se incluyó una población de la raza Palomero Toluqueño, como grupo externo. Dicha extracción se llevó a cabo con el uso del paquete comercial “Charge Switch gDNA Plant Kit” (Invitrogen), y con un robot de extracción de ADN (King Fhisher Flex Serie Port RS-232C Thermo Scientific[®], Waltham, MA). Se realizó la PCR múltiple con iniciadores organizados en ocho grupos, utilizando 31 *loci* de SSR, los cuales se eligieron de la base de datos Maize Genetics and Genomics Database (MaizeGDB, por sus siglas en inglés, en <http://www.maizegdb.org/ssr.php#>): Grupo 1: *phi015*, *phi033*, *phi051*, *phi115* y *phi127*; Grupo 2: *phi024*, *phi034*, *phi053*, *phi072*, *phi085*, *phi093* y *phi121*; Grupo 3: *phi050*, *phi056* y *phi064*; Grupo 4: *phi96100*, *phi101249* y *phi109188*; Grupo 5: *phi029*, *phi073*, *phi96342* y *phi109275*; Grupo 6: *phi265454*, *phi402893* y *phi427913*; Grupo 7: *phi308090*, *phi330507* y *phi346482*; y Grupo 8: *phi159819*, *phi213398* y *phi339017*. Cada mezcla de reacción de PCR múltiple se llevó a un volumen final de 25 μL (amortiguador 10X, 10 mM dNTPs, 25 mM MgCl_2 , 1U *Taq* ADN polimerasa, 4 pM de cada par de iniciadores, 10 ng μL^{-1} de ADN molde y agua HPLC). El protocolo de amplificación consistió en desnaturalización inicial por 4 min a 95°C, seguido de 25 ciclos de 1 min a 95°C (desnaturalización); 2 min a 55°C (alineación); 2 min a 72°C (extensión), y una extensión final de 1 h a 72°C. La evaluación de los *loci* SSR se realizó mediante inyección electrocinética de las muestras y electroforesis capilar en un Secuenciador de ADN (Genetic Analyzer ABI 3130[®], Applied Biosystems, Foster City, CA); para estimar el tamaño de los alelos resultantes se utilizó un marcador de peso molecular estándar interno de ADN (LIZ-500, que detecta fragmentos de 35 a 500 nucleótidos). Los 31 pares de iniciadores fueron marcados con etiquetas fluorescentes 6-FAM, ROX y HEX en el

extremo 5' para su detección en el secuenciador de fragmentos. La identificación de los alelos presentes se hizo con el programa GeneMapper® v. 4.0 (Applied Biosystems, 2005). Se calcularon también las frecuencias alélicas de los SSR en cada población, por medio del software POPGENE, v. 1.31 (Yeh *et al.*, 1999), se discriminaron alelos para evitar problemas de distanciamiento e interpretación de datos que se generan con alelos no significativos; se omitieron los no significativos ($\alpha \leq 0.05$) en el análisis de varianza simple, con raza como fuente de variación, de esta forma 200 alelos fueron seleccionados como variables moleculares.

4.5. Análisis estadístico

Se obtuvieron las medias poblacionales de cada una de las 16 variables morfológicas y se conjuntaron en una sola matriz con las frecuencias altamente significativas correspondientes a 200 alelos elegidos de los marcadores moleculares. Se realizó una estandarización sobre la matriz básica de datos combinada (216 variables), restando a cada una de las observaciones la media del carácter y dividiendo por la desviación estándar del mismo. Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con base en la matriz de correlaciones; así como un análisis de conglomerados utilizando las distancias Gower (1971), el cual se recomienda para datos mixtos a fin de estimar la semejanza entre poblaciones con datos combinados por medio del método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) para obtener un árbol filogenético.

Con el fin de comparar el grado de concordancia entre los datos morfológicos y los moleculares SSR con los datos mixtos, se construyó una matriz de distancias para cada caso (euclidianas, Rogers modificada por Wright, 1978 y Gower) y se aplicó una prueba de Mantel (1967), para generar una correlación entre pares de matrices (euclidianas *vs* Rogers modificada; euclidianas *vs* Gower; Rogers modificada *vs* Gower). Una correlación $r = 1.0$ indica que las poblaciones más cercanas deberían ser las más parecidas y la ausencia de correlación indica que la similitud entre las subpoblaciones no depende de su distancia (Demey *et al.*, 2008). La prueba indica que valores de $r = 0.50$ o superiores son estadísticamente significativos al nivel del 1%.

Se emplearon los paquetes estadísticos Statistical Analysis System (SAS) de versión 9.3 para Windows (SAS Institute, 2002) para el análisis de componentes principales y la obtención

de las distancias genéticas con el coeficiente de Gower; mientras que el software NTSYSpc versión 2.21 h (Rohlf, 2009), se empleó para la obtención del filograma y la prueba de Mantel.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Análisis de componentes principales

Los resultados muestran que con los primeros 16 CP se explica poco más del 50 % de la varianza global; mientras que con los dos primeros se explica el 13.6 % de tal varianza (CP1: 8.3% y CP2: 5.3%) (Cuadro 3.1). Si bien estos valores parecieran ser bajos, las representaciones con datos moleculares y/o datos mixtos generalmente no muestran porcentajes de explicación de la varianza elevados con los primeros componentes (Demey *et al.*, 2008), mientras que con datos morfológicos, con pocos CP se explica un alto porcentaje de la varianza global, tal como se ha observado en estudios en maíz como los de Beyene *et al.* (2005); López-Romero *et al.* (2005); Mijangos-Cortés *et al.* (2007); Ángeles-Gaspar *et al.* (2010); Chávez-Servia *et al.* (2011); Ramírez *et al.* (2013).

Cuadro 3.1. Componentes principales (CP), valores propios y porcentaje de la varianza global explicada y acumulada a partir de información conjunta de 16 variables morfológicas y de polimorfismo de 200 loci SSR.

CP	Valor propio	Proporción de varianza explicada	Porcentaje de varianza acumulada
1	16.362	0.082	8.26
2	10.560	0.053	13.60
3	8.326	0.042	17.80
4	7.988	0.040	21.84
5	7.416	0.037	25.58
6	6.557	0.033	28.89
7	5.590	0.028	31.72
8	5.446	0.028	34.47
9	4.950	0.025	36.97
10	4.635	0.023	39.31
11	4.472	0.023	41.57
12	4.159	0.021	43.67
13	4.091	0.021	45.73
14	3.663	0.019	47.58
15	3.592	0.018	49.40
16	3.341	0.017	51.09

De las 216 variables analizadas, tanto morfológicas como de SSR, 9.25% (20 variables, Cuadro 3.2) son los vectores característicos o son las variables que más aportan o contribuyen en la determinación de los primeros dos componentes principales y por consecuencia en la dispersión de las poblaciones en el plano bidimensional de los CP1 y CP2 (Figura 3.1), debido a que presentaron los valores absolutos mayores o iguales a ± 0.15 y también fueron las variables con correlaciones superiores a 0.63; al respecto Sánchez (1995) menciona que las variables que presentan vectores más largos son aquellas que influyen más en las agrupaciones, así como variables que presentan alta y estrecha correlación entre ellas, por el contrario las variables que presentan vectores de menor longitud y no muestran alta correlación, son las que raramente intervienen en las agrupaciones. De las 20 variables, el 60% corresponden a variables morfológicas y son en general de importancia en la determinación del CP1 y en consecuencia la distribución de las poblaciones en el CP1, mientras que el 40% restante son variables moleculares y fueron más relevantes para determinar al CP2 (Cuadro 3.2, Figura 3.1). En este sentido, los caracteres morfológicos reflejan alta variabilidad y contribuyen de mejor manera en la conformación de los componentes; Vigouroux *et al.* (2002) mencionan que las especies cultivadas han experimentado una fuerte presión de selección dirigida a genes que controlan características de importancia agromorfológica, lo que ha reducido la diversidad genética en algunas regiones genómicas, mientras que los genes que no tienen presión de selección mantienen similitud con sus parientes silvestres. La selección que ha realizado el ser humano durante la domesticación del maíz y su mejoramiento genético ha reducido la variación en exceso sobre todo en los genes para los que dicha especie poseía variación alélica; mientras que otros *loci* experimentan modificación de la diversidad acorde con el efecto natural (Vigouroux *et al.*, 2002).

Cuadro 3.2. Variables de mayor importancia en los vectores característicos de CP1 y CP2 generados para 87 poblaciones pertenecientes a diez razas mexicanas de maíz a partir de información combinada de tipo morfológico y de polimorfismo de SSR.

Variable	Vector característico	
	CP1	CP2
<i>phi015 I</i>	0.166	-0.055
<i>phi050 G</i>	-0.062	0.171
<i>phi109188 B</i>	0.184	0.053
<i>phi346482 A</i>	0.023	0.189
<i>phi346482 Q</i>	-0.079	-0.150
<i>phi213398 D</i>	-0.079	0.160
<i>phi213398 E</i>	-0.019	0.181
<i>phi213398 F</i>	0.012	-0.157
Floración femenina (FF)	-0.088	0.162
Altura de planta (AP)	-0.113	0.203
Hileras de la mazorca (HM)	0.176	0.025
Ancho de la hoja de la mazorca(AHM)	-0.109	0.187
Longitud de la mazorca (LM)	-0.192	0.045
Peso de 100 semillas (P100G)	-0.203	-0.020
Diámetro de la mazorca (DM)	-0.156	0.024
Relación LM/DM	-0.194	0.021
Diámetro del olote (DO)	-0.168	-0.015
Ancho del grano (AG)	-0.213	-0.029
Relación AG/LG	-0.179	-0.080
Espesor del grano (EG)	-0.173	-0.086

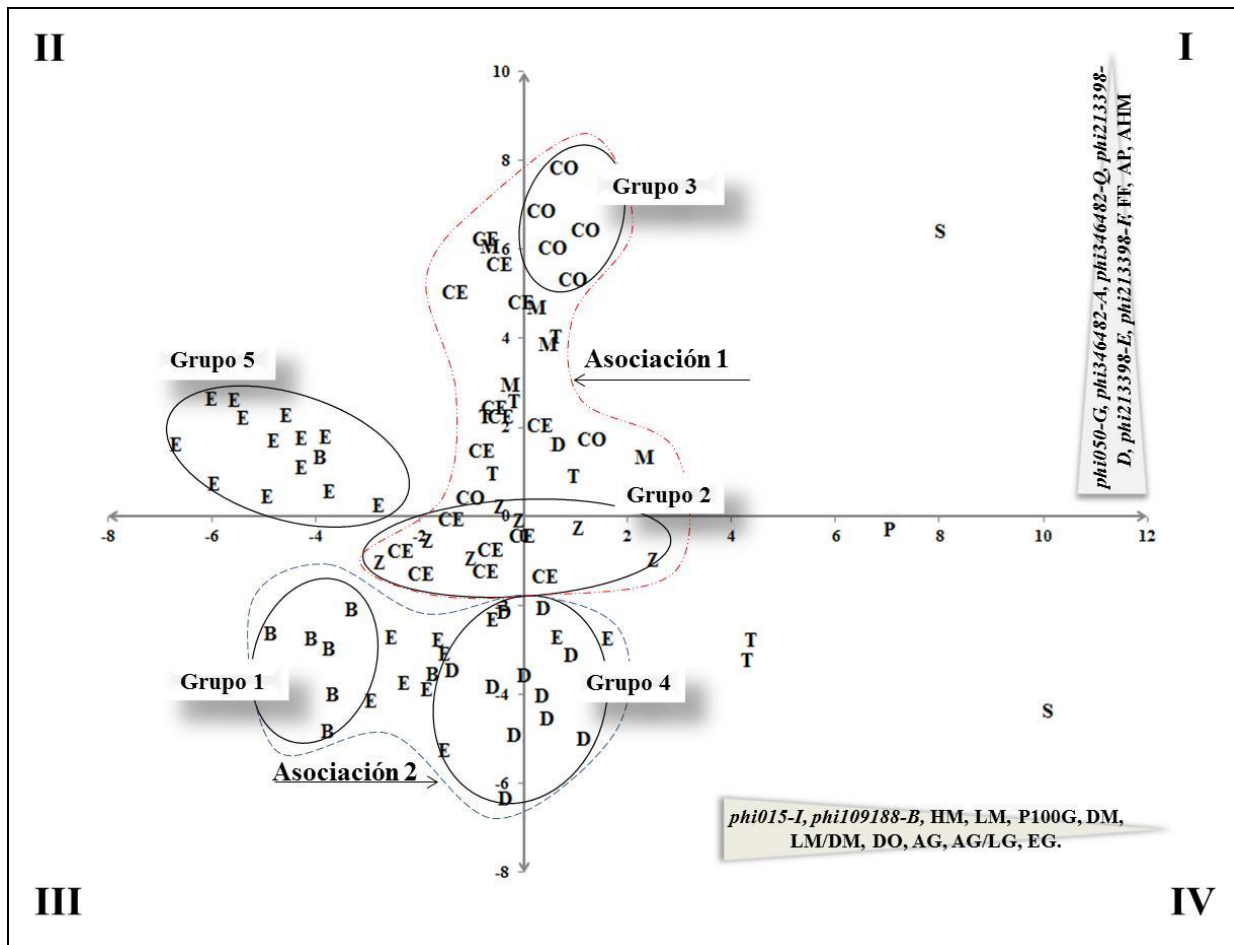


Figura 3.1. Distribución de 87 poblaciones de maíz perteneciente a diez razas mexicanas sobre el plano bidimensional de los CP1 y CP2. B= Bofo, CE= Celaya, CO= Coscomatepec, D= Dulce, E= Elotes Occidentales, M= Mushito, P= Palomero de Jalisco, S= Serrano de Jalisco, T= Tablilla de Ocho, Z= Zamorano Amarillo.

Era de esperarse que los caracteres moleculares sobresalieran en la contribución a los CP, ya que fueron más abundantes (200 alelos) y presentan más ventajas que las variables morfológicas (Cuadro 3.2); sin embargo, la neutralidad de este tipo de marcadores quita poder discriminante, con respecto a las poblaciones, pues la presencia de estos marcadores no está asociada con diferenciación fenotípica que es en lo que se basa el concepto razas, y la forma en que se ha venido realizando el mejoramiento empírico y científico. En cuanto a la influencia de los caracteres morfológicos y su proyección en la configuración de la diversidad entre las poblaciones de maíz, puede ser atribuible a que las características consideradas son estables con repetitividad alta, siendo apropiados para describir a las poblaciones, agruparlas de manera más precisa dentro de cada raza y valorar la diversidad genética racial (Sánchez *et al.*, 1993; Sánchez

et al., 2000), sin dejar de lado la aportación de los marcadores moleculares SSR que al ser específicos evaluando segmentos del genoma, ser codominantes y estables resultan muy informativos al combinarlos en estudios amplios de diversidad, donde se desconoce la estructura genética de la población y estos resultados se ajustan a la realidad (Demey *et al.*, 2008).

Sánchez *et al.* (2000) han sugerido que conjuntar información de diferente índole (morfológicos e isoenzimáticos) para análisis de la diversidad de maíz permite analizar toda la variabilidad y obtener un análisis más preciso, mejor distribución y definición de la clasificación de accesiones dentro de razas y establecer complejos raciales. Cuando se combinan dos conjuntos de datos de diferente categoría, tal es el caso de continuos *vs* discretos o morfológicos *vs* moleculares, la resolución en los estudios de clasificación racial, interrelación racial o de diversidad genética es mejor (Demey *et al.*, 2008); sin embargo, no existe un criterio universal de cuando usar uno u otro y en este caso el análisis en conjunto indicó que las variables morfológicas tienen mayor contribución que las moleculares en la distribución de las poblaciones en los CP. Demey *et al.* (2008) demostraron que las caracterizaciones generadas por descriptores morfológicos de las hechas por marcadores moleculares, suelen ser independientes respondiendo en cada caso a reglas y presiones evolutivas diferentes; y no necesariamente de índole genético; además, se considera que en muchos estudios no son utilizadas las herramientas metodológicas que permiten cuantificar y tipificar el tipo de relación y determinar la proporción de la variabilidad que es explicada por uno u otro tipo de marcador (Wilson *et al.*, 1977).

La dispersión de las poblaciones en un plano bidimensional de CP1 y CP2 muestra la formación de cinco grupos relacionados con una o dos razas en específico: Grupo 1: raza Bofo; Grupo 2: Celaya y Zamorano Amarillo; Grupo 3: Coscomatepec; Grupo 4: Dulce; Grupo 5: Elotes Occidentales. También es posible apreciar dos asociaciones entre las poblaciones de algunas razas que no se pudieron ubicar en un grupo específico: Asociación 1, conformada por los Grupos 2 y 3, en la que se presenta relación con las razas Mushito y Tablilla de Ocho; la Asociación 2 está ubicada entre el Grupo 1 y el 4, pero se relaciona con algunas poblaciones de Elotes Occidentales que no se integraron en el Grupo 5 (Figura 3.1). La aportación de cada uno de los tipos de marcadores (morfológicos y SSR, Cuadro 3.2) y su asociación permite separar a las poblaciones de maíz en estos cinco grupos, debido al comportamiento que presentó cada

población valorado por el conjunto de datos combinados y que de esta manera también intervienen en la formación de diferentes combinaciones de los individuos al visualizar otros componentes (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos en este estudio corroboraron la clasificación de las accesiones en los bancos de germoplasma; además, cabe señalar que las agrupaciones y asociaciones entre poblaciones fueron más precisas en comparación con las obtenidas al analizar variables morfológicas y moleculares (datos no mostrados) en forma independiente. Por lo tanto, de manera general, estudios que incorporan descriptores morfológicos y marcadores moleculares proveen mejor descripción e interpretación de la diversidad genética de los individuos (Hillis y Wiens, 2000; Demey *et al.*, 2003).

Las dos asociaciones que se presentan entre las poblaciones de las diez razas en estudio corresponden probablemente a infiltración genética de germoplasma entre las poblaciones de cada raza; es decir, variabilidad genética intra e interracial, lo que conlleva a tener un continuo de diversidad en ellas. Wellhausen *et al.* (1951) mencionan que es necesario considerar la naturaleza continua de la variación, pues existen accesiones con expresión intermedia debido a la introgresión de una raza a otra, que genera mezclas entre ellas y que en el largo plazo pueden conducir al establecimiento de nuevas razas con identidad propia o subgrupos dentro de razas.

Las accesiones de Palomero de Jalisco y Serrano de Jalisco se ubicaron de manera distante al resto de las poblaciones, lo que indica que comparten menos características en cuanto a los marcadores SSR y morfológicos; aunque es recomendable analizar un mayor número de poblaciones en cada una de estas razas para tener la certeza de que son diferentes. Sánchez *et al.* (2000) mencionan que los valores de diversidad genética se ven afectados por el número de accesiones dentro de los grupos raciales; una accesión por razas puede resultar insuficiente para representar a la misma y para estudiar las relaciones raciales (Goodman y Paterniani, 1969). La variación en el número de accesiones y la conformación final de cada grupo racial pueden estar influenciadas por las interacciones de tipo ambiental y epistático, presentes en toda evaluación morfológica (Tanksley, 1983). Por su parte, los SSR proporcionan la capacidad de diferenciar

individuos cuando se examinan varios *loci* debido a su alto polimorfismo, naturaleza multialélica y alta variabilidad de estos marcadores (Hokanson *et al.*, 1998).

5.2. Análisis de agrupamiento

Las interrelaciones filogenéticas entre las poblaciones de maíz (Figura 3.2) mantienen aproximadamente un 74% de concordancia con las agrupaciones apreciadas en el ACP (Figura 3.1). Las relaciones filogenéticas se representaron en cuatro grupos, entre los cuales algunos corresponden con la raza a la que se asignaron las poblaciones en forma original en los banco de germoplasma; igualmente, se puede apreciar a poblaciones que no se agrupan con las de su raza, y que se encuentran entre el continuo de la definición de una raza en un grupo con alguna otra agrupación. De esta forma se definen las siguientes agrupaciones:

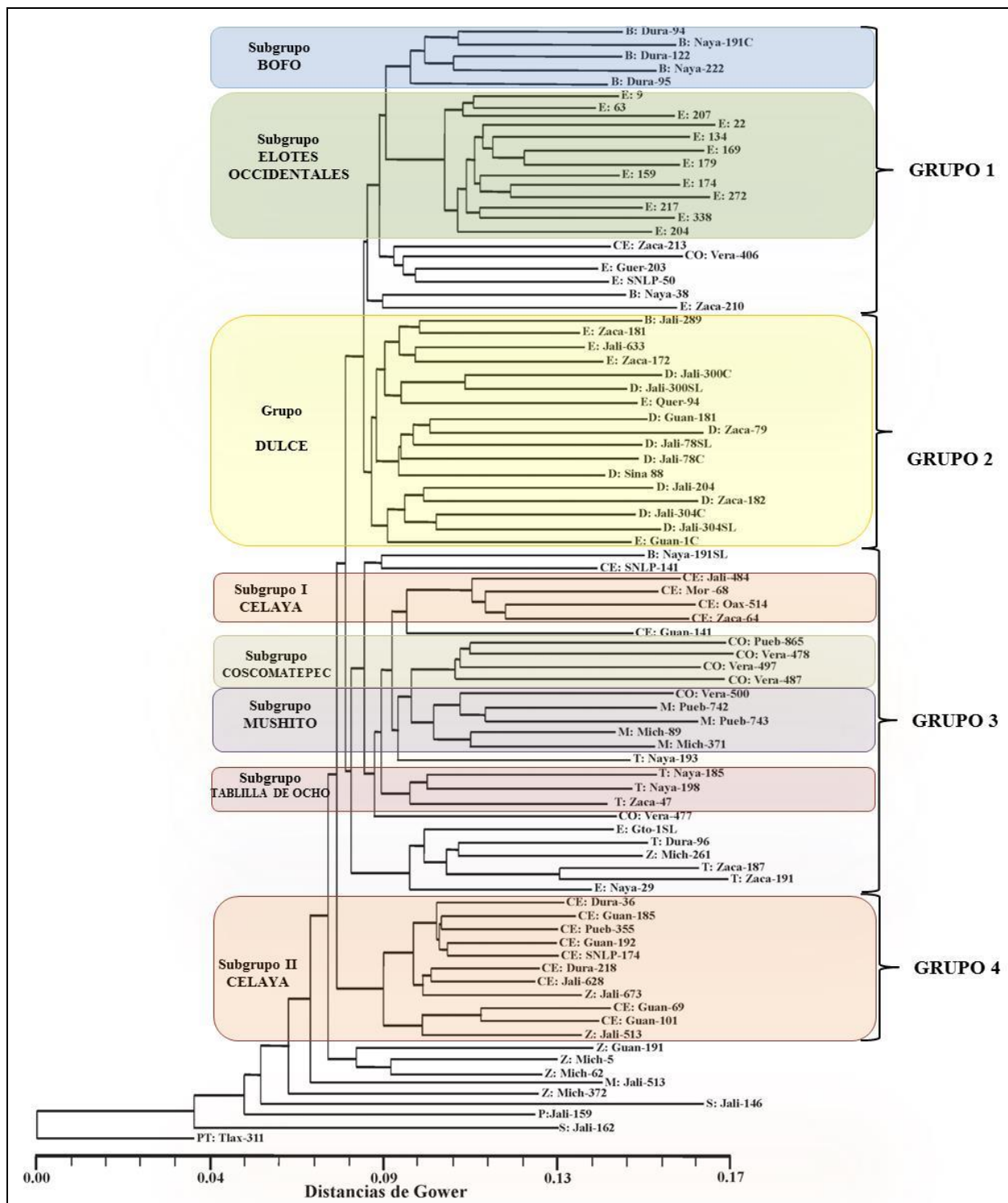


Figura 3.2. Árbol filogenético construido con distancias de Gower derivadas de 200 alelos SSR y 16 caracteres morfológicos mediante el método de agrupamiento Neighbor-Joining. B= Bofo, CE= Celaya, CO= Coscomatepec, D= Dulce, E= Elotes Occidentales, M= Mushito, P= Palomero de Jalisco, S= Serrano de Jalisco, T= Tablilla de Ocho, Z= Zamorano Amarillo, PT= Palomero Toluqueño.

Grupo 1: se ubica en la parte superior del filograma y forma dos subgrupos claramente diferenciados, el primer subgrupo corresponde a la raza Bofo, conformado por cinco de las ocho poblaciones que se evaluaron inicialmente (lo que corresponde a 62.5% de accesiones de esta raza). Un segundo subgrupo con 57%, de las poblaciones de la raza Elotes Occidentales, es decir, 13 de 23 poblaciones. Es importante mencionar que las poblaciones de este subgrupo (Colectas del estado de Guerrero, México) se mantuvieron constantes en el ACP (Figura 3.1) y en el filograma (Figura 3.2) y la misma tendencia se presentó en los análisis en forma independiente tanto para los datos morfológicos como los moleculares (datos no mostrados); es decir, se trata de poblaciones estables y con amplia diversidad intra-racial con buena diferenciación de otras agrupaciones y razas, aspecto que no sucede con el resto de las poblaciones pertenecientes a esta raza, pues es posible verlas distribuidas en el continuo del filograma formando parte de otras agrupaciones o subgrupos (Figura 3.2). Wellhausen *et al.* (1951) mencionan que existen dos tipos de Elotes Occidentales: los de la Altiplanicie de Jalisco, típicas y muy similares a la raza Harinoso de Ocho y los de la cuenca del Río Balsas y las llanuras costeras del Estado de Guerrero que han perdido gran cantidad de su textura harinosa y han sido modificados considerablemente por las otras razas comunes de estas regiones; de ahí es posible inferir que las poblaciones de este subgrupo sin duda pertenecen a esta derivación de Elotes Occidentales.

Grupo 2: está conformado por 92% de las accesiones de la raza Dulce, formando una agrupación consistente; conformada por poblaciones muy estables y que se diferencian del resto de las poblaciones (Figura 3.2). Molina (1992) hace mención que en el maíz Dulce se presenta el mecanismo de incompatibilidad gametofítica, y por lo que puede ocurrir mayor tasa de fecundación entre poblaciones dentro de la misma raza. Por otro lado, la homogeneidad entre las poblaciones de esta raza puede deberse a que es una de las razas con usos especiales, que se siembran en campos pequeños y en forma aislada, y en la cual la semilla utilizada para el siguiente ciclo de siembra generalmente proviene de un pequeño número de mazorcas (Sánchez *et al.*, 2000), lo que le confiere estabilidad interracial y diferenciación con otras razas.

Grupo 3: es uno de los grupos más grandes y más diversos; contiene en su estructura por lo menos, una accesión de cada raza evaluadas en este estudio, excepto para las razas Palomero de Jalisco y Serrano de Jalisco; este grupo tiene semejanza con las accesiones que forman la

Asociación 1 del ACP (Figura 3.1); sin embargo, es posible apreciar más subgrupos que los que se forman en los CP; se pueden diferenciar cuatro subgrupos bien definidos y por su ubicación en el filograma en forma descendente se tiene un subgrupo constituido por accesiones de la raza Celaya (I); otro que corresponde a la raza Coscomatepec; uno de Mushito, y uno de Tablilla de Ocho, con 27, 57, 80 y 43%, respectivamente, del total de las accesiones evaluadas de cada raza para cada subgrupo. Se aprecia en la parte inferior de esta agrupación la presencia de accesiones de Zamorano Amarillo, y dos accesiones de Tablilla de Ocho las cuales están distantes con respecto al resto de las poblaciones en el filograma (Figura 3.2) y esto posibilita visualizarlo de igual forma con las poblaciones en el ACP (Figura 3.1).

Grupo 4: las poblaciones de este grupo se encuentran muy cercanas a la parte inferior del filograma, y está conformado por poblaciones de la raza Celaya como un subgrupo (II) específico para esta raza (Figura 3.2), y correspondiente al que se formó en el Grupo 2 del ACP (Figura 3.1), lo compone el 60% de las accesiones evaluadas para esta raza. Wellhausen *et al.* (1951) clasifican a esta raza dentro de las razas Modernas Incipientes y los estudios de Sánchez *et al.* (2000) corroboran que se trata de una raza reciente, lo que también se aprecia en el filograma de este estudio (Figura 3.2), pues son las accesiones menos alejadas genéticamente, ya que un árbol no jerárquico como el que se presenta, tiene tasas de evolución no constantes a lo largo de las distintas ramas (Avice, 2004), deduciendo que esta es la agrupación más joven evolutivamente hablando.

Las relaciones evolutivas entre las diferentes razas de maíz mostradas en el filograma (Figura 3.2) están determinadas por información generada con los marcadores moleculares del tipo SSR, así como con los morfológicos. Al establecer una población de la raza Palomero Toluqueño como raza antigua (Wellhausen *et al.*, 1951; Kato *et al.*, 2009) se puede apreciar que dicha raza está relacionada con todas las poblaciones en estudio, dando indicios que es una raza ancestral y que está estrechamente relacionada con las poblaciones de Palomero de Jalisco y Serrano de Jalisco pues están muy cercanas a este ancestro ubicadas de forma aislada en el extremo inferior del filograma. Al igual que estas razas, las poblaciones de la raza Zamorano Amarillo se localizan en la parte inferior del filograma, tanto en subgrupos como en forma aislada, formando una sola rama (Figura 3.2). Todo lo anterior indica claramente que existen

características de SSR y morfológicas que se comparten entre las poblaciones y que la capacidad discriminatoria de estos marcadores en conjunto se ve reflejada en la capacidad para separar cada población en grupos y subgrupos e incluso en forma individual.

5.3. Prueba de Mantel

De acuerdo a la prueba de Mantel, se encontró que el consenso entre las distancias euclidianas de los datos morfológicos y las distancias genéticas modificadas de Rogers a partir de los datos moleculares, con respecto al coeficiente de distancias genéticas de Gower de los datos en conjunto arrojó correlaciones altas, positivas y significativas de 0.626 y 0.767, respectivamente, por lo tanto, existe una congruencia del 63% y 77% entre las distancias y las agrupaciones de las poblaciones de maíz con respecto a las variables estudiadas; esta congruencia indica que ambos sistemas de marcadores usados en forma combinada en el análisis son adecuados para el estudio de la estructura genética de las accesiones de maíz, lo que concuerda con los estudios de Sánchez *et al.* (2000) con información morfológica e isoenzimática y de Santacruz-Varela *et al.* (2004), combinando marcadores moleculares SSR, isoenzimas y morfología, concluyendo que al combinar datos de diversas líneas de evidencia se favorece el entendimiento de la diversidad en maíz. Demey *et al.* (2003) al analizar conjuntamente información molecular, morfológica y bioquímica en una colección de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), reportan un consenso de 66.5% y concluyen que hay correlación significativa entre la información molecular y morfológica.

Por otro lado, la correlación entre las distancias morfológicas vs moleculares presentó una $r = 0.25$ no significativa, lo que determina que la distancia entre los parámetros en forma independiente, sin considerar los parámetros combinados, es menos importante que al incluir dichos datos combinados. Beyene *et al.* (2005) mencionan que correlaciones significativas indican que los conjuntos de datos reflejan el mismo patrón de diversidad genética y que validan el uso de estos datos para realizar análisis estadísticos de diferentes tipos, como conglomerados sobre diferentes poblaciones.

De manera general, los estudios que incorporan diferentes marcadores, tales como caracteres morfológicos y marcadores moleculares o simplemente diferentes tipos de marcadores moleculares u de otra índole, proveen mejor descripción e interpretación de la diversidad asociadas a caracteres altamente heredables que no interaccionan con el ambiente y tienen importancia económica o en los que la región del genoma que se explore sea más grande (Demey *et al.*, 2003).

6. CONCLUSIONES

El análisis combinado de caracteres de índole morfológica y molecular (SSR) permitió separar en grupos a las poblaciones confirmando su clasificación racial en los bancos de germoplasma y explicando las interrelaciones raciales entre estos genotipos. Los grupos se conformaron por razas formándose un grupo o subgrupo específico para ocho de las diez razas estudiadas, entre ello se tiene, un grupo de la raza Bofo, Celaya, Coscomatepec, Dulce, Elotes Occidentales, Mushito, Tablilla de Ocho y Zamorano Amarillo, con alto porcentaje de poblaciones que correspondieron a una raza específica en cada grupo (>74%), de igual forma altos porcentajes de congruencia entre los análisis efectuados (62% al 77%).

El análisis de caracteres morfológicos y marcadores moleculares SSR conjuntamente permite estudiar la asociación entre los mismos caracteres y su relación con las poblaciones, de tal manera que se puede identificar alta variabilidad genética intra e inter-racial, siendo más alta entre las razas, que entre las poblaciones pertenecientes a cada raza, lo que favorece la formación de grupos específicos.

7. LITERATURA CITADA

- Anderson E, H C Cutler (1942)** Races of *Zea mays*: I. Their recognition and classification. Annals of the Missouri Botanical Garden 29: 69-88.
- Ángeles-Gaspar E, E Ortiz-Torres, P A López, G López-Romero (2010)** Caracterización y rendimiento de poblaciones de maíz nativas de Molcaxac, Puebla. Revista Fitotecnia Mexicana 33: 287-296.

- Applied Biosystems (2005)** GeneMapper[®] Software version 4.0. Reference and Troubleshooting Guide. Applied Biosystems Inc. Foster City, CA. 82 p.
- Avise J C (2004)** Molecular Markers, Natural History and Evolution. Sinauer Associates. 2nd edition. Sunderland, MA, U.S.A. 684 p.
- Beyene Y, A M Botha, A A Myburg (2005)** A comparative study of molecular and morphological methods of describing genetic relationships in traditional Ethiopian highland maize. African Journal of Biotechnology 4: 586-595.
- Bull J J, J P Huelsenbeck, C W Cunningham, D L Swofford, P J Waddell (1993)** Partitioning and combining data in phylogenetic analysis. Systematic Biology 42: 384-397.
- Chávez-Servia J L, P Diego-Flores, J C Carrillo-Rodríguez (2011)** Complejos raciales de poblaciones de maíz evaluadas en San Martín Huamelulpan, Oaxaca. Ra Ximhai Revista Científica de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable 7: 107-115.
- Chippindale P T, J J Wiens (1994)** Weighting, partitioning, and combining characters in phylogenetic analysis. Systematic Biology 43: 278-287.
- de Queiroz A (1993)** For consensus (sometimes). Systematic Biology 42: 368-372.
- Demey J R, A Y Zambrano Y, F Fuenmayor V Segovia (2003)** Relación entre caracterizaciones molecular y morfológica en una colección de yuca. Interciencia 28: 684-689.
- Demey J R, J L Vicente-Villardón, M P Galindo-Villardón, A Y Zambrano (2008)** Identifying molecular markers associated with classification of genotypes by External Logistic Biplots. Bioinformatics 24: 2832-2834.
- Goodman M M, E Paterniani (1969)** The races of maize: III. Choices of appropriate characters for racial classification. Economic Botany 23: 265-273.
- Gower J C (1971)** A general coefficient of similarity and some of its properties. Biometrics 27: 857-874.
- Hillis D M, J J Wiens (2000)** Molecules versus morphology in systematics. *In*: Phylogenetic analysis of morphological data. Wiens, J.J. (eds). Smithsonian Institution Press. Washington. USA. pp: 1-19.
- Hokanson S C, A K Szewc-McFadden, W F Lamboy, J R McFerson (1998)** Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus* ×

- domestica* Borkh. Core subset collection. Theoretical and Applied Genetics 97: 671-683.
- Kato Y T A, C Mapes S, L M Mera O, J A Serratos H, R A Bye B (2009)** Origen y Diversificación del Maíz. Una Revisión Analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D. F. 115 p.
- López-Romero G, A Santacruz-Varela, A Muñoz-Orozco, F Castillo-González, L Córdova-Téllez, H Vaquera-Huerta (2005)** Caracterización morfológica de poblaciones nativas de maíz del Istmo de Tehuantepec, México. *Interciencia* 30: 284-290.
- Mantel N (1967)** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Matsuoka Y, Y Vigouroux, M M Goodman, J Sánchez G, 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.
- Mijangos-Cortés J O, T Corona-Torres, D Espinosa-Victoria, A Muñoz-Orozco, J Romero-Peñaloza, A Santacruz-Varela (2007)** Differentiation among maize (*Zea mays* L.) landraces from the Tarasca Mountain Chain, Michoacan, Mexico and the *Chalqueño* complex. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 309-325.
- Molina G J D (1992)** Introducción a la Genética de Poblaciones y Cuantitativa (Algunas Implicaciones en Genotecnía). AGT Editor, S. A. México, D. F. 349 p.
- Moritz C, D M Hillis (1996)** Molecular systematics: context and controversies. *In: Molecular Systematics*. 2nd ed. D M Hillis, C Moritz, B K Mable (eds.). Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. pp: 1-13.
- Patterson C, D M Williams, C J Humphries (1993)** Congruence between molecular and morphological phylogenies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 153-188.
- Ramírez J A, G García de los S, A Carballo C, F Castillo G, J A Serratos, J Cadena I (2013)** Caracterización morfológica de una muestra etnográfica de maíz (*Zea mays* L.) raza bolita de Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícola* 4: 895-907.
- Rohlf F J (2009)** NTSYSpc: numerical taxonomy system. Version 2.21h. Exeter Software: Setauket: New York.
- Saitou N, M Nei (1987)** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.

- Sánchez G J J (1995)** El análisis biplot en clasificación. *Revista Fitotecnia Mexicana* 18: 188-203.
- Sánchez G J J, M M Goodman, J O Rawlings (1993)** Appropriate characters for racial classification in maize. *Economic Botany* 47: 44-59.
- Sánchez G J J, M M Goodman, C W Stuber (2000)** Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Economic Botany* 54: 43-59.
- Santacruz-Varela A, M P Widrlechner, K E Ziegler, R J Salvador, M J Millard, P K Betting (2004)** Phylogenetic relationships among North American Popcorns and their evolutionary links to Mexican and South American popcorns. *Crop Science* 44: 1456-1467.
- SAS Institute (2002)** The SAS[®] System for Windows[®] (version 9.3). Statistical Analysis System Institute Inc. Cary, N.C., U.S.A. 4424 p.
- Tanksley S D (1983)** Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 3-8.
- Vigouroux Y, M McMullen, C T Hittinger, K Houchins, L Schulz, S Kresovich, Y Matsuoka, J Doebley (2002)** Identifying genes of agronomic importance in maize by screening microsatellites for evidence of selection during domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 9650-9655.
- Yeh F C, R C Yang, T Boyle (1999)** POPGENE version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide. University of Alberta and Centre for International Forestry Research. Edmonton, Canada 28 p.
- Wellhausen E J, L M Roberts, E Hernández X (en colaboración con 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.
- Wilson A C, S S Carlson, T J White (1977)** Biochemical evolution. *Annual Review Biochemistry* 46: 473-639.
- Wright S (1978)** *Evolution and the Genetics of Populations*. Vol. 4. Variability within and among Natural Populations. University of Chicago Press. Chicago, IL., U.S.A. 510 p.

CONCLUSIONES GENERALES

Fue posible determinar que existe alta diversidad fenotípica y genética entre y dentro de las poblaciones de maíz en estudio.

Mediante la caracterización morfológica se conjuntó a las poblaciones de maíz en grupos raciales definidos por su fenotipo por medio de 16 caracteres morfológicos con alta repetitividad y poco influenciados por el ambiente.

El estudio por medio de los microsatélites confirmó la diversidad que se reporta con la caracterización morfológica por medio de la presencia de 646 alelos, y 20.81 alelos por *loci* y 127 (19.66%) alelos exclusivos, un valor de heterocigosidad esperada (H_e) de 0.764, expresándose alto nivel de diversidad molecular.

Se apreció deficiencia de heterocigotos entre las poblaciones y entre las razas e incremento en el grado de endogamia de las poblaciones de maíz.

La combinación de los caracteres morfológicos y moleculares permitió corroborar las relaciones inter-raciales obtenidas en forma independiente, ya que permitió separar a las poblaciones en grupos consistentes, confirmando su clasificación racial en los bancos de germoplasma.

Cuando se combinaron los dos conjuntos de datos, la resolución de los resultados fue mejor y más precisa que al realizar los análisis en forma independiente, por lo que facilitó la descripción e interpretación de la diversidad genética de las poblaciones y razas en estudio.

La distribución de las poblaciones se visualizó en un continuo formándose complejos raciales relacionados con la distribución geográfica o a su asociación de condiciones ecológicas entre las poblaciones y razas en el país, así como por la relación que comparten entre caracteres morfológicos y entre la base de marcadores estables y neutros, como son los SSR.

Las poblaciones que presentaron consistencia y diferenciación racial entre los análisis, fueron las pertenecientes a las razas Bofo, Celaya, Coscomatepec, Dulce, Elotes Occidentales, Mushito, Tablilla de Ocho y Zamorano Amarillo, con porcentajes altos de coincidencia entre poblaciones y sus agrupaciones (74 al 100%), y congruencia entre análisis (62% al 77%), lo que se atribuye al tamaño de muestra, variabilidad de las poblaciones, al número de marcadores tanto morfológico como moleculares utilizados y a las técnicas de análisis de datos empleadas.

Es necesario profundizar este tipo de estudios en razas como Palomero de Jalisco y Serrano de Jalisco con mayor número de poblaciones por raza, ya que aunque presentaron consistencia en su comportamiento en los resultados, la representatividad no fue similar al de las otras razas.