

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
SANTO DOMINGO

“CARACTERIZACIÓN AGROMORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE 49  
ACCESIONES DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL PROGRAMA DE MAÍZ  
(*Zea mays L.*) DE LA EET-PICHILINGUE DEL INIAP EN EL CANTÓN  
QUEVEDO DE LA PROVINCIA DE LOS RÍOS”

EVELYN NATALY RUIZ RONQUILLO

INFORME TÉCNICO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

SANTO DOMINGO - ECUADOR

2011

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
SANTO DOMINGO

“CARACTERIZACIÓN AGROMORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE 49  
ACCESIONES DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL PROGRAMA DE MAÍZ  
(*Zea mays L.*) DE LA EET-PICHILINGUE DEL INIAP EN EL CANTÓN  
QUEVEDO DE LA PROVINCIA DE LOS RÍOS”

EVELYN NATALY RUIZ RONQUILLO

INFORME TÉCNICO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO  
REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA  
AGROPECUARIA

SANTO DOMINGO - ECUADOR

2011

iii

**“CARACTERIZACIÓN AGROMORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE 49  
ACCESIONES DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL PROGRAMA DE MAÍZ  
(*Zea mays L.*) DE LA EET-PICHILINGUE DEL INIAP EN EL CANTÓN QUEVEDO  
DE LA PROVINCIA DE LOS RÍOS”**

**EVELYN NATALY RUIZ RONQUILLO**

**REVISADO Y APROBADO**

**MAY. ESP. ING. RENÉ GONZÁLES  
COORDINADOR DE CARRERA  
CARRERA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**ING. XAVIER DESIDERIO  
DIRECTOR**

**DRA. VENUS AREVALO  
CODIRECTORA**

**ING. VINICIO UDAY  
BIOMETRISTA**

---

**SECRETARIO ACADEMICO**

**“CARACTERIZACIÓN AGROMORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE 49  
ACCESIONES DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL PROGRAMA DE MAÍZ  
(*Zea mays L.*) DE LA EET-PICHILINGUE DEL INIAP EN EL CANTÓN QUEVEDO  
DE LA PROVINCIA DE LOS RÍOS”**

**EVELYN NATALY RUIZ RONQUILLO**

APROBADO POR LOS SEÑORES MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN  
DEL INFORME TÉCNICO

	CALIFICACIÓN	FECHA
<b>ING. XAVIER DESIDERIO</b> <b>DIRECTOR</b>	_____	_____
<b>DRA. VENUS AREVALO</b> <b>CODIRECTORA</b>	_____	_____

**CERTIFICO QUE ESTAS CALIFICACIONES FUERON PRESENTADAS EN ESTA  
SECRETARIA**

\_\_\_\_\_  
**SECRETARIO ACADEMICO**

## CERTIFICACION

Ing. Xavier Desiderio

Dra. Venus Arévalo

### **Certifican:**

Que el trabajo titulado trabajo “Caracterización agromorfológica y molecular de 49 accesiones del Banco de Germoplasma del Programa de Maíz (*Zea mays L.*) de la EET-Pichilingue del INIAP en el cantón Quevedo de la provincia de Los Ríos”, realizado por EVELYN NATALY RUIZ RONQUILLO, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a que la investigación aporta con novedosa información estandarizada acerca de la diversidad genética presente en germoplasmas de maíz, que servirán como recursos para la generación de nuevas variedades, que aporten con el desarrollo agrícola del Litoral ecuatoriano, se recomienda su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a EVELYN NATALY RUIZ RONQUILLO que lo entregue a Mayo ESP. René Gonzales, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

---

Ing. Xavier Desiderio

DIRECTOR

---

Dra. Venus Arévalo

CODIRECTORA

## **AUTORIZACIÓN**

Yo, EVELYN NATALY RUIZ RONQUILLO

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la institución del trabajo “Caracterización agromorfológica y molecular de 49 accesiones del Banco de Germoplasma del Programa de Maíz (*Zea mays L.*) de la EET-Pichilingue del INIAP en el cantón Quevedo de la provincia de Los Ríos”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

---

**EVELYN NATALY RUIZ RONQUILLO**

## **DEDICATORIA**

El esfuerzo y esmero depositados en esta tesis están dedicados, en primer lugar a Dios, mi roca y fortaleza durante todo este proceso.

A mis padres Edison Ruiz y Sonia Ronquillo, ejemplos de trabajo honesto y perseverante, por su amor y apoyo incondicional.

Y a mi amado esposo David Correa, por la ayuda desinteresada y el ánimo que me brinda día a día para la culminación de este trabajo.

## **AGRADECIMIENTO**

Mis más sinceros agradecimientos a mi familia por brindarme generosa colaboración en sus hogares para la realización de esta tesis. Al Programa de Maíz de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP y su personal técnico por su valioso aporte en la ejecución de este proyecto, especialmente al Ing. José Luis Zambrano por su acertada guía para la elaboración de esta tesis.

A la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias Santo Domingo de la ESPE y sus docentes, por la educación y formación impartida durante mis años como estudiante, sobre todo al Ing. Xavier Desiderio, por su contribución como director de tesis y a la Dra. Venus Arévalo, por su apoyo como codirectora de tesis.

A los Ing. Iván Garzón, Ing. Eduardo Morillo e Ing. Gabriela Miño, así como a todos quienes conforman los Departamentos de Biotecnología, tanto de la Estación Experimental Santa Catalina como de la EET-Pichilingue por las facilidades prestadas en sus laboratorios y la cooperación personal ofrecida para la realización de mi investigación.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	Pág.
ÍNDICE DE CONTENIDO	viii
ÍNDICE DE CUADROS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
Objetivo General	4
Objetivos Específicos	4
II. REVISION DE LITERATURA	5
2.1. RECURSOS FITOGENÉTICOS	5
2.2. BANCOS DE GERMOPLASMA	6
2.3. COLECCIONES DE GERMOPLASMA	8
2.3.1. Colecciones de Germoplasma de Maíz	9
2.4. CARACTERIZACIÓN AGROMORFOLÓGICA DEL GERMOPLASMA	11
2.4.1. Los Descriptores	12
2.5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GERMOPLASMA	13
2.5.1. Marcadores Moleculares	15
2.6. TÉCNICAS BASADAS EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	16
2.6.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	16
2.6.2. Funcionamiento de la PCR	17
2.6.3. Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)	19
2.6.4. Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados al Azar (RAPD)	19
2.6.5. Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados (AFLP)	20
2.6.6. Número Variable de Repeticiones en Tandem (VNTRs)	21

<b>CONTENIDO</b>	<b>Pág.</b>
Minisatélites	22
Microsatélites o SSR	23
2.7. DIVERSIDAD GENÉTICA Y FITOMEJORAMIENTO	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. CARACTERIZACIÓN AGROMORFOLÓGICA	28
3.1.1. Ubicación del Lugar de Investigación	28
3.1.1.1. Ubicación política	28
3.1.1.2. Ubicación geográfica	28
3.1.1.3. Características climáticas	29
3.1.2. Materiales	29
3.1.3. Métodos	30
3.1.3.1. Diseño experimental	30
Tratamientos	30
Tipo de diseño	30
Repeticiones y bloques	30
Características del ensayo	32
Croquis de campo	33
3.1.3.2. Análisis estadístico	34
Análisis de varianza	34
Análisis de componentes principales (ACP)	34
Valor discriminante de variables	35
Matriz de distancia y estructura taxonómica	35
3.1.3.3. Variables a medir	36
3.1.3.4. Métodos específicos de manejo del experimento	42
Análisis de suelo	42
Preparación del suelo	43

<b>CONTENIDO</b>	<b>Pág.</b>
Semilla y siembra	43
Fertilización	43
Cruzamientos fraternales	43
Control de malezas	44
Controles fitosanitarios	44
Cosecha	44
3.2. CARACTERIZACION MOLECULAR	45
3.2.1. Ubicación del Lugar de Investigación	45
3.2.1.1. Ubicación política	45
3.2.1.2. Ubicación geográfica	45
3.2.1.3. Características climáticas	46
3.2.2. Materiales	46
3.2.2.1. Reactivos	46
3.2.2.2. Materiales	47
3.2.2.3. Equipos	47
3.2.3. Métodos	49
3.2.3.1. Procedimientos de laboratorio	49
Extracción de ADN genómico	49
Cuantificación de ADN	50
Verificación del ADN	51
PCR para microsatélites	52
Amplificación de loci microsatélites	53
3.2.3.2. Análisis estadístico	57
Interpretación de imágenes y resultados del DNA	
Analyzer 4300 Li-Cor	57
Parámetros de diversidad genética clásica	57

<b>CONTENIDO</b>	<b>Pág.</b>
Análisis de conglomerados (UPGMA)	58
Similitud genética	58
Análisis de componentes principales	59
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>60</b>
<b>4.1. CARACTERIZACIÓN AGROMORFOLÓGICA</b>	<b>60</b>
4.1.1. Variabilidad Morfológica	60
4.1.2. Análisis de Componentes Principales (ACP)	65
4.1.3. Valor Discriminante de las Variables	69
4.1.4. Matriz de Distancia y Estructura Taxonómica	70
4.1.5. Incremento de Semillas	72
<b>4.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR</b>	<b>74</b>
4.2.1. Interpretación del DNA Analyzer 4300 LI-COR	74
4.2.2. Parámetros de Diversidad Genética Clásica	74
4.2.3. Análisis de Conglomerados	79
4.2.4. Similitud Genética	79
4.2.5. Componentes Principales	80
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>82</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>88</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	<b>90</b>
<b>VIII. RESUMEN</b>	<b>91</b>
<b>IX. SUMMARY</b>	<b>92</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>93</b>
<b>XI. ANEXOS</b>	<b>102</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO N°</b>	<b>Pág.</b>
Cuadro 1. Accesiones conservadas a nivel mundial en los bancos genéticos de maíz	10
Cuadro 2. Germoplasma del Programa de Maíz utilizado en la caracterización agromorfológica	31
Cuadro 3. Accesiones de maíz utilizadas en la caracterización molecular	48
Cuadro 4. Programa del termociclador	52
Cuadro 5. Combinación de primers microsatélites	52
Cuadro 6. Mezcla de reactivos para cada reacción	53
Cuadro 7. Programa configurado para el termociclador	53
Cuadro 8. Mezcla de reactivos para una reacción de amplificación en PCR	56
Cuadro 9. Programa configurado de 29-33 ciclos para el termociclador	56
Cuadro 10. Parámetros estadístico resumen de las variables cuantitativas evaluadas en 45 accesiones de maíz en la EET Pichilingue, en el 2009	61
Cuadro 11. Promedios registrados de las variables cuantitativas evaluadas en las accesiones de maíz, en la EET Pichilingue, en el 2009.	63
Cuadro 12. Modas de las variables cualitativas evaluadas en las accesiones de maíz, en la EET Pichilingue, en el 2009	63
Cuadro 13. Valores propios y proporción de la varianza explicada en el análisis de los componentes principales	66
Cuadro 14. Vectores propios de los dos primeros componentes (e1 y e2) y correlación entre las variables originales y los dos primeros componentes (CP1 y CP2)	68
Cuadro 15. Proporción de la varianza explicada por cada variable original sobre los dos primeros componentes principales	69
Cuadro 16. Conglomeración en tres grupos de los 45 tratamientos de maíz evaluadas en la EET Pichilingue en el 2009	71

<b>CUADRO N°</b>	<b>Pág.</b>
Cuadro 17. Promedios de las distancias de Gower calculadas entre las accesiones de maíz evaluadas en la EET Pichilingue, en el 2009	71
Cuadro 18. Incremento de semillas de las líneas de maíz evaluadas	73
Cuadro 19. Alelos reportados por los primers microsatélites	75
Cuadro 20. Frecuencias alélicas por locus	76
Cuadro 21. PIC calculado para cada marcador microsatélite	76
Cuadro 22. Cantidad de genotipos homo y heterocigotos por cada primer microsatélite	77
Cuadro 23. Porcentajes de homocigocis y heterocigocis reportados por accesión	78
Cuadro 24. Conglomerados formados mediante coeficiente de Jaccard	79
Cuadro 25. Distancias según coeficiente de Jaccard entre accesiones y conglomerados	80
Cuadro 26 Resumen de los valores propios y proporción de la varianza explicada	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura N°</b>	<b>Pág.</b>
Figura 1. El germoplasma y su proceso en un instituto investigativo	7
Figura 2. Ciclo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	17
Figura 3. VTNRs: Cuatro pares de cromosomas de homólogos en tres individuos	21
Figura 4. Ubicación del la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP	28
Figura 5. Longitud y tipo de panoja	38
Figura 6. Escala para enfermedades foliares propuesta por el CIMMYT	39
Figura 7. Longitud de la mazorca	39
Figura 8. Diámetro de la mazorca	40
Figura 9. Ubicación del la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP	45
Figura 10. Representación gráfica de la proporción de la varianza explicada por cada componente principal	67

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo N°</b>	<b>Pág.</b>
Anexo 1) SSR's utilizados para la caracterización molecular de las líneas de maíz	102
Anexo 2) Promedios (ajustados) de las variables cuantitativas evaluadas en los 45 tratamientos	103
Anexo 3) Modas obtenidas (de tres repeticiones) en las variables cualitativas evaluadas	105
Anexo 4) Matriz de similitud generada a partir de los resultados de las variables cualitativas y cuantitativas mediante el coeficiente de Gower	107
Anexo 5) Dendograma representativo de la agrupación de las 45 accesiones de maíz en función del coeficiente de distancia de Gower	109
Anexo 6) Características morfológicas de los 3 morfotipos o grupos definidos mediante la caracterización morfológica	110
Anexo 7) Matriz resultado del genotipaje de ADN de las accesiones de maíz en el DNA Analyzer 4300 Li-Cor con los SSR's	113
Anexo 8) Matriz de similitud para análisis molecular según coeficiente de Jaccard y agrupamiento UPGMA	115
Anexo 9) Dendograma de la agrupación de las 39 accesiones en función del coeficiente de distancia de Jaccard y agrupamiento UPGMA	117

## I. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays L.*) es una especie única por la gran diversidad genética de la planta, la mazorca y el grano; en nuestro país es un grano básico, sobre todo en la alimentación de personas y animales. De acuerdo con los datos de III Censo Nacional Agropecuario, la superficie total sembrada con maíz duro seco a nivel nacional es de 270.585 ha, encontrándose el 75.2% en la región costa (Junovich, 2003).

Durante los últimos años, la diversidad del maíz ha sido objeto de estudio con diversos propósitos, siendo uno de éstos conocer la variabilidad y plantear la utilización de esta variabilidad en los programas de fitomejoramiento (Jaramillo y Baena, 2000; Gallardo y Moyano, 2002; Sánchez, 2002; Morales, 2003).

En el país se cuenta con información estandarizada sobre germoplasma de maíz de la sierra ecuatoriana, producto de la caracterización agromorfológica de 711 accesiones y molecular de 185 accesiones del banco de germoplasma del DENAREF (Morillo y Piedra, 2002; Yáñez *et al.*, 2003; Taba, 2005).

Por su parte, el Programa de Maíz de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP cuenta con un banco de germoplasma donde se almacenan accesiones de maíz de diferentes procedencias y cualidades, algunas de las cuales han servido para la obtención de variedades mejoradas (INIAP-515; VS-2; PICHILINGUE-504) e híbridos (INIAP H- 550; H-551; H-552), que han contribuido con el desarrollo agrícola del país, específicamente en la zona central del Litoral ecuatoriano. Actualmente en este banco se conservan 2309 accesiones desde el año 1998<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Programa de Maíz de la EET-Pichilingue del INIAP. 2009. Comunicación personal

Las exigencias del mercado están poniendo en evidencia cada vez más la necesidad de hacer investigaciones en una gama más amplia de material genético, que el que se ha venido usando en los diferentes programas de fitomejoramiento (Hernández y Esquivel, 2004). Los mejoradores de los cultivos se ven en la necesidad de manejar eficazmente sus poblaciones de mejoramiento a fin de conservar una variación genética adecuada, que permita alcanzar mejoras futuras en los cultivos mediante selección. Así, los estudios de diversidad genética se están convirtiendo en una de las labores primordiales de los programas de fitomejoramiento a nivel nacional e internacional.

El desarrollo de un sistema de documentación sólido acerca de las características de los materiales conservados en los bancos de germoplasma, constituye un apoyo para los fitomejoradores, puesto que permitirá establecer prioridades, planificar las actividades de manejo y optimizar recursos (Painting *et al.*, 1993; Stuber y Hancock, 2008).

Los datos acerca de las accesiones son casi tan valiosos como el material vegetal mismo, en vista de que el conocimiento de la diversidad genética en el germoplasma contribuye no sólo a sostener la mejora genética, sino también a reducir la vulnerabilidad genética a las plagas y enfermedades (George *et al.*, 2004).

Una de las consecuencias del fitomejoramiento convencional es la gran reducción de variabilidad genética del cultivo en proceso de selección. Cuanto más exitosa es la selección, mayor es la disminución de la variación genética de un cultivo particular. Actualmente, existe una creciente preocupación entre los mejoradores de maíz para expandir la búsqueda de genes útiles que aumenten la variabilidad genética e incrementen la sostenibilidad de la producción (Yunbi y Crouch, 2008).

La tendencia general en el Programa de Maíz de la EET-Pichilingue, ha sido usar el mismo germoplasma disponible para los trabajos de fitomejoramiento en repetidas ocasiones. La gran mayoría de las accesiones disponibles en el banco de germoplasma son escasamente usadas por los mejoradores para los trabajos de fitomejoramiento. La principal fuente de variabilidad genética usada en los trabajos proviene en general de los pocos materiales conocidos por los mejoradores o de intercambios de germoplasma con otras instituciones y mejoradores.

Para que los recursos fitogenéticos puedan ser aprovechados por los mejoradores de Maíz, se requiere que el material conservado se encuentre debidamente caracterizado, sin embargo, existe una considerable brecha entre el número de materiales conservados y el de aquellos de los que se tienen datos de caracterización.

Tradicionalmente para estimar la diversidad genética de las plantas han sido utilizados los marcadores morfológicos y de rendimiento, pese a que carecen muchas veces de objetividad y definición por la acentuada influencia que el ambiente tiene sobre la expresión de estas características. Para la mayoría de los rasgos agronómicos, la compleja relación entre la información genética y variación fenotípica no está suficientemente bien definida.

La dificultad en diferenciar genotipos sólo en base a caracteres fenotípicos, sin información de caracterización molecular, conlleva a una subutilización de los recursos fitogenéticos conservados en el banco de germoplasma, además de incrementos de los costos de mantención, regeneración, caracterización y documentación del material por presencia de duplicados en los materiales conservados. Los ensayos convencionales, como tales, tienen un poder estadístico bajo, ya que usan a menudo sólo dos o tres repeticiones y aplican protocolos de clasificación que, aunque rápidos, no son necesariamente exactos. Estos ensayos no

tienen suficiente dominio estadístico para identificar duplicados. Sería necesario repetir los ensayos, medir muchas más variables con mayor exactitud y hacer más repeticiones, para lograr este objetivo, prácticas que requerirán un costo mucho mayor (Engels y Viser, 2007).

### **Objetivo General**

- Conocer la diversidad genética del banco de germoplasma del Programa de Maíz de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP, con el fin de identificar morfotipos y grupos heteróticos disponibles para futuros trabajos de fitomejoramiento en el cultivo de maíz.

### **Objetivos Específicos**

- Caracterizar agromorfológica y molecularmente 49 accesiones de maíz del banco de germoplasma del Programa de Maíz de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP.
- Identificar las variables agromorfológicas y los marcadores genéticos de mayor valor discriminante en la caracterización de las 49 accesiones de maíz del banco de germoplasma del Programa de Maíz de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP.
- Refrescar e incrementar la semilla de las 49 accesiones de maíz del banco de germoplasma del Programa de Maíz de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.5. RECURSOS FITOGENÉTICOS

Los recursos fitogenéticos son la suma de todas las combinaciones de genes resultantes de la evolución de una especie. Comprenden desde especies silvestres con potencial agrícola hasta genes clonados (Hidalgo citado por Jaramillo y Baena, 2000).

El término [recursos genéticos](#) implica que el material (el [germoplasma](#)) tiene o puede tener valor económico o utilitario, actual o futuro, siendo especialmente importante el que contribuye a la seguridad alimentaria ([IBPGR](#)<sup>2</sup> citado por Jaramillo y Baena, 2000).

Los genes que están contenidos en los organismos vivos, son los responsables de las características de los seres vivos. Un genotipo es toda una combinación única y diferenciada de genes de un organismo y los bancos genéticos son los sitios donde se almacenan sistemáticamente los genotipos de las plantas.

Desde la antigüedad, los agricultores han sido los custodios de los recursos genéticos vegetales, pero hoy el germoplasma de las especies cultivadas se preserva cada vez más en bancos genéticos. Los bancos genéticos ofrecen a los fitomejoradores muestras de germoplasma bien preservadas y evaluadas, de fácil alcance para poder afrontar las muchas amenazas que pesan sobre la productividad agrícola (Jaramillo y Baena, 2000).

---

<sup>2</sup> IBPGR: International Board for Plant Genetic Resources, posteriormente llamado IPGRI

## 2.2. BANCOS DE GERMOPLASMA

Se define como germoplasma, al material que se mantiene, ya sea semilla, cultivo de tejido o plantas en crecimiento activo. Este germoplasma se conserva en distintos tipos de colecciones; que son utilizadas por el banco de germoplasma de diferentes maneras (Painting *et al.*, 1993).

El principal método de conservación de los recursos fitogenéticos "ex situ" (fuera de su lugar) ha sido el uso de los bancos de germoplasma (almacenamiento a baja temperatura y humedad) (Puldon, 2006).

Según Biasutti (2007), las principales actividades y objetivos de los bancos de germoplasma son:

- Adquisición: Por colecta de materiales y/o introducción de otros países.
- Conservación: De la viabilidad de los materiales así como de la variabilidad genética de las colecciones.
- Caracterización y evaluación: Descripción botánica y características fisiológicas, agronómicas, bioquímicas y moleculares de las accesiones.
- Documentación: Manejo sistemático de la información para hacer accesible la utilización e intercambio de las colecciones.
- Multiplicación: Incremento de las entradas para disponer de material para su conservación y/o utilización.
- Utilización: Acondicionamiento de las colecciones para ser incorporadas a los programas de mejoramiento genético.

En cada una de las diferentes actividades que se llevan a cabo en un banco de germoplasma (Figura 1) y previo a ellas, se genera información de gran utilidad

sobre cada accesión, la cual debe estar debidamente documentada (Froylan y Gonzales, 1990).

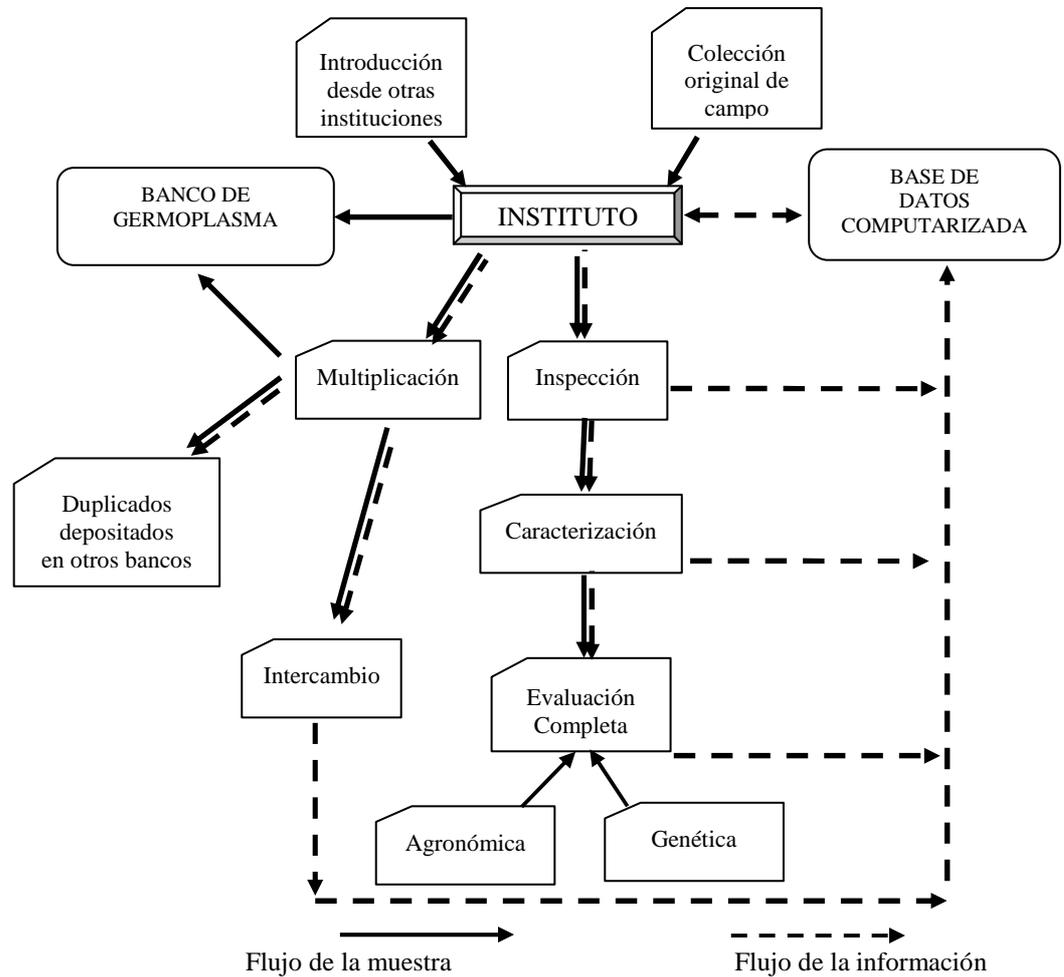


Figura 1. El germoplasma y su proceso en un instituto investigativo (Plucknett et al., 1992).

Según Painting *et al.* (1993), un sistema de documentación sólido es de vital importancia en el manejo de un banco para establecer prioridades, planificar actividades y manejar recursos.

En el último inventario, los bancos de genes del mundo custodiaban cerca de 1,5 millones de accesiones únicas de cultivos alimentarios y sus parientes silvestres, lo que ofrece a los fitomejoradores de todo el mundo una fuente

invaluable de diversidad genética para los programas de mejoramiento de los cultivos (FAO, 2004).

### **2.3. COLECCIONES DE GERMOPLASMA**

Las colecciones de germoplasma son congregaciones representativas que pueden contener desde decenas hasta miles de muestras de una variación de genotipos en forma de accesiones, que se conservan con un objetivo específico y en las mejores condiciones (Plucknett *et al.*, 1992; Jaramillo y Baena, 2000; Puldon, 2006).

Se conoce como *accesión* a cada muestra que se ha recibido en el banco de germoplasma para procesamiento, y eventual almacenamiento y evaluación (Plucknett *et al.*, 1992).

Comúnmente, los bancos de germoplasma conservan el material genético en más de una colección o bajo varias condiciones de almacenamiento, principalmente como garantía en contra de pérdidas y para simplificar prácticas de trabajo (Painting *et al.*, 1993).

Puldon (2006), clasifica a las colecciones según sus características en:

- **Colección base:** Se conserva a largo plazo y no es usada como fuente de distribución rutinaria.
- **Colección activa:** Se utiliza para regeneración, multiplicación, distribución, caracterización y evaluación, contiene cantidad suficiente de muestras para estar disponibles cada vez que sea necesario.

- Colección de núcleo: Es una muestra representativa de la colección que incluye la variabilidad genética de un cultivo y las especies emparentadas con un mínimo de repeticiones.
- Colección de trabajo: Utilizada por los fitomejoradores en su trabajo. La conservación no constituye una prioridad este tipo de colección.

### **2.3.1. Colecciones de Germoplasma de Maíz**

Los cereales son generalmente los vegetales mejor conservados a nivel mundial, en el caso de maíz se cuenta con cerca de 100.000 accesiones en los bancos genéticos mundiales y un 95% de las razas nativas ya recolectadas. La dispersa ubicación geográfica de los bancos de germoplasma de maíz refleja la importancia global de este producto. En el Cuadro 1, se detallan las colecciones de germoplasma conservadas en diferentes partes del mundo. Las mayores colecciones de germoplasma de maíz están en Rusia, y en Serbia, donde se alojan 30.000 accesiones a medio y a largo plazo (Fletcher citado por Plucknett *et al.*, 1992).

Cuadro 1. Accesiones conservadas a nivel mundial en los bancos genéticos de maíz (tomado de Plucknett *et al.*, 1992; Yáñez *et al.*, 2003 y FAO, 2004).

<b>Accesiones</b>	<b>Almacenamiento</b>	<b>Institución</b>	<b>Localidad/País</b>
15.084	Mediano y largo plazo	VIR <sup>3</sup>	San Petersburgo, Rusia
15.000	Mediano plazo	IMR	Belgrado, Serbia
11.100	Mediano y largo plazo	CIMMYT	El Batán México
10.000	Mediano plazo <sup>4</sup>	INIA	Chapingo, México
7.619	Largo plazo	NSSL <sup>3</sup>	Colorado, EEUU
7.145	Mediano plazo	UNA	Lima, Perú
5.000	Corto plazo	ICA	Medellín, Colombia
3.200	Corto plazo	RICTP	Fundulea, Rumania
3.000	Mediano y largo plazo	INTA	Pergamino, Argentina
3.000	Mediano plazo	USA	Iowa, EEUU
2.800	Largo plazo	PGRO	Otawa, Canadá
2.654	Mediano plazo	NIAS <sup>3</sup>	Tsukuba, Japón
2.220	Mediano plazo	CIFEP	Cochabamba, Bolivia
1.678	Mediano y largo plazo	IPB	Los Baños, Filipinas
1.571	Corto plazo <sup>4</sup>	IARI	Nueva Delhi, India
1.500	Mediano plazo	NARS	Kitale, Kenia
1.368	Mediano plazo	CRIFC	Sukamandi, Indonesia
1.040	Mediano y largo plazo	INIA	Madrid, España
1.000	Corto plazo	CNU	Daejeon, Corea
1.000	Mediano plazo <sup>4</sup>	MI	Braga, Portugal
2.309	Corto plazo	INIAP	Quevedo, Ecuador
1.842	Corto plazo	UNL	Loja, Ecuador
1.608	Mediano plazo	INIAP	Quito, Ecuador
50	Corto plazo	INIAP	Portoviejo, Ecuador

<sup>3</sup> Colección básica diseñada por el IBPGR; <sup>4</sup> Instalación a largo plazo en construcción

## 2.4. CARACTERIZACIÓN AGROMORFOLÓGICA DEL GERMOPLASMA

Una de las tareas asociadas a los bancos de germoplasma, que facilita en gran medida la utilización de las accesiones, es la adecuada descripción de las mismas (Jaramillo y Baena, 2000).

El objetivo principal de la caracterización es la identificación de las accesiones (Abadie y Berretta, 2001). Esta constituye una de las actividades rutinarias en proyectos de investigación que involucren el estudio y la valoración de germoplasma. Para el caso del maíz, esta actividad puede servir para diferenciar accesiones de una misma especie, determinar su utilidad, estructura, variabilidad y relaciones entre ellas, además para localizar genes que estimulen su uso en la producción o en el mejoramiento de cultivos, ya sea en un estudio de líneas, variedades o en la valoración de germoplasma local (Segovia y Fuenmayor, 2000 y Jaramillo y Baena, 2000).

Según Plucknett *et al.* (1992), para cada accesión se debe examinar el comportamiento de rendimiento y otros caracteres en presencia de plagas y enfermedades. Además el material a menudo deberá ser escrutado en un laboratorio para conocer otras propiedades, con el fin de identificar materiales adaptables y útiles para la producción de alimentos y/o el mejoramiento de cultivos.

En la caracterización se registra la expresión de caracteres cualitativos constantes en los diversos estados fisiológicos de la planta (fenotipo). Los datos se toman en el estado de plántula, antes de y durante la floración, y en la etapa de producción, y se suman a los datos de pasaporte, previamente registrados durante la colecta o adquisición del material (Jaramillo y Baena, 2000).

Según la FAO (citada por Abadie, 2001), los caracteres de importancia agronómica son los de mayor interés para los mejoradores, ya que reflejan los patrones evolutivos del cultivo, resultantes de la selección impuesta por agricultores y por estreses bióticos y abióticos. Lamentablemente, son también caracteres de difícil medición, herencia compleja y muy influenciados por el ambiente.

La caracterización del germoplasma puede realizarse utilizando una gran variedad de métodos tales como: marcadores morfológicos y caracteres agronómicos; marcadores citológicos (cariotipos); marcadores bioquímicos (análisis de isoenzimas, electroforesis de proteínas, metabolitos secundarios) y marcadores moleculares (RFLPs, AFLPs, RAPDs, SSRs y otros)<sup>5</sup> ([Potter y Jones](#), y [Harding](#), citados por **Campos y Seguel, 2000**).

#### **2.4.1. Los Descriptores**

Según Jaramillo y Baena (2000), los descriptores son las características mediante las cuales se puede conocer el germoplasma y determinar su utilidad potencial. Deben ser específicos para cada especie, diferenciar los genotipos y expresar el atributo de manera precisa y uniforme. Muchos atributos pueden describir un material pero los caracteres realmente útiles son aquellos que:

- Se pueden detectar a simple vista
- Se registran fácilmente
- Son de alto valor taxonómico y agronómico

---

<sup>5</sup> Descripción de estos marcadores en páginas 19-25

- Permiten diferenciar una accesión de otra.

El IBPGR (hoy Bioversity International), regularmente publica las listas de descriptores para las especies cultivadas y sus parientes silvestres (Plucknett *et al.*, 1992). Estos descriptores definen las características más relevantes y la forma en que estas deben ser registradas, permitiendo además, la selección del germoplasma deseado. Por otra parte, el uso de estos descriptores propicia un lenguaje común de la información y a la vez fomenta el intercambio más eficiente tanto de la información como del material genético entre bancos de germoplasma y usuarios en general (Froylan y Gonzales, 1990).

No todas las características de una planta se expresan con la misma intensidad. Algunas, especialmente las cuantitativas, pueden presentar diferentes grados de expresión, que se registran mediante escalas de valor (generalmente entre 1 y 9) denominadas estados del descriptor. Tal es el caso de la resistencia o susceptibilidad a diferentes tipos de estrés biótico (plagas y enfermedades) y abiótico (sequía, salinidad, acidez o baja fertilidad del suelo) ([IPGRI](#)<sup>6</sup>, citado por Jaramillo y Baena, 2000).

## **2.5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GERMOPLASMA**

La caracterización de un genotipo es el registro de rasgos fenotípicos altamente heredables cuya expresión no es modificada por el ambiente (IBPGR citado por Bonamico *et al.*, 2004). Marcadores morfológicos y de rendimiento han sido

---

<sup>6</sup> International Plant Genetic Resources Institute, antes llamado IBPGR.

embargo las características fenotípicas no arrojan resultados certeros sobre la

composición genotípica de los individuos (Stuber *et al.* citados por Bonamico *et al.*, 2004).

Westman y Kresovich (citados por Abadie y Berretta, 2001), señalan que la caracterización molecular es una valiosa alternativa para estimar la diversidad genética de las colecciones, y por tanto ayudar a establecer criterios para mejorar la representatividad de las mismas. Sin embargo, esta caracterización no necesariamente sustituye la realizada para características morfológicas y agronómicas, ya que los dos tipos de información tienen historias evolutivas diferentes y pueden estar mostrando facetas diferentes de la diversidad. Desde el punto de vista del mejoramiento genético, la información sobre caracteres morfológicos y agronómicos es insustituible, ya que incorporar variantes en estos caracteres es en muchos casos el objetivo de los programas (Abadie y Berretta, 2001).

En la actualidad, la información de la caracterización molecular es utilizada por laboratorios de análisis y mejoramiento como una herramienta complementaria a la caracterización realizada con datos morfológicos. Las tecnologías basadas en el empleo de marcadores moleculares son de utilidad no sólo en la caracterización de genotipos sino que también juegan un papel cada vez más importante en las investigaciones de similitud o distancia genética, que permiten obtener una clasificación de los mismos en diferentes grupos (Pejic *et al.*, 1998).

El desarrollo de marcadores genéticos es importante en la determinación de la pureza varietal, requerimiento fundamental en la producción de semilla híbrida, ya que la misma influye favorablemente en características esperadas por el

agricultor; tales como, el rendimiento, la uniformidad y la calidad (Bonamico *et al.*, 2004).

### **2.5.1. Marcadores Moleculares**

La tendencia actual para trabajos de caracterización es utilizar marcadores moleculares, entendiéndose por tal, a todo aquel sistema que permite detectar variabilidad directamente al nivel del ADN (Ácido Desoxirribonucleico) (**Campos y Seguel, 2000**).

Un marcador molecular o de ADN que pueda ser utilizado en genética debe presentar un patrón de herencia conocido y mostrar polimorfismo, es decir, deben existir distintas variables o “alelos” del marcador dentro de la población bajo estudio (Araneda, 2004).

Jiménez y Collada (2000), indican que los marcadores de ADN presentan las siguientes cualidades:

- Permiten seleccionar regiones concretas dentro de la molécula de ADN para estudios determinados
- El número de polimorfismos detectables es teóricamente ilimitado
- Permiten analizar tanto la información que se expresa como la que no se expresa
- En la actualidad se ha desarrollado un gran número de técnicas adecuadas a diferentes situaciones.

Por otra parte su expresión, a diferencia de los marcadores morfológicos, no es influenciada por los factores del medio ambiente, es decir que, reflejan el nivel real de la diferencia genética existente entre los genotipos.

El uso de marcadores moleculares permite determinar una serie de interrogantes como: análisis de diversidad genética, estudios de relaciones filogenéticas entre especies, identificación de materiales duplicados en las colecciones y análisis molecular de los procesos de regeneración de germoplasma (Legesse *et al.*, 2006).

## 2.6. TÉCNICAS BASADAS EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

### 2.6.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica de biología molecular mediante la cual un pequeño fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) se clona o duplica varias veces para obtener copias múltiples.

La PCR opera en forma de ciclos, cada uno de ellos duplica la cantidad de ADN, por lo que permite obtener hasta mil millones de copias de un solo fragmento en unas pocas horas. La técnica es sencilla y pueden utilizarla científicos sin demasiada formación en biología molecular (Encarta, 2008).

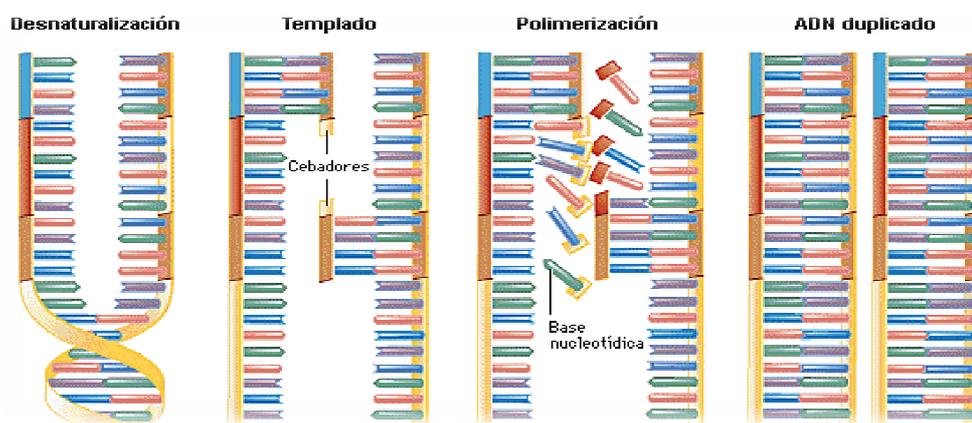


Figura 2. Ciclo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Encarta, 2008).

### **2.6.2. Funcionamiento de la PCR**

La reacción en cadena de la polimerasa imita el fenómeno de replicación o reproducción del ADN que ocurre de forma natural en las células vivas, proceso de copia que tiene lugar cuando la célula se divide y da lugar a la formación de un par de cadenas hijas por cada una de las cadenas parentales.

La polimerasa necesita otros dos ingredientes para copiar ADN. El primero es una reserva de los cuatro bloques básicos que constituyen la molécula de ADN, llamados nucleótidos o bases. El segundo es una fibra corta de ADN copiado, que se llama cebador oligonucleotídico, formado por varios nucleótidos que inician la replicación.

La reacción tiene lugar en tres fases. Durante la primera o “desnaturalización” la plantilla o fragmento original de ADN se calienta hasta una temperatura de 90 a 95 °C durante 30 segundos; esto provoca la separación de las dos cadenas. En la segunda fase, llamada “templado”, la temperatura de la mezcla se rebaja hasta 55 °C durante 20 segundos para que los cebadores oligonucleotídicos se enlacen con el ADN dividido. En la tercera fase o de “polimerización”, la temperatura de la mezcla se eleva hasta 75 °C para que la polimerasa copie rápidamente la molécula de ADN.

Estas tres fases constituyen un ciclo completo de PCR, que se realiza en menos de dos minutos. Teóricamente, el ciclo de PCR se puede repetir sin límite, pero la polimerasa, los nucleótidos y los cebadores suelen renovarse al cabo de unos 30 ciclos. Estos 30 ciclos, que duran menos de tres horas, bastan para producir mil millones de copias de ADN.

En las versiones modernas de la PCR se utiliza una polimerasa termoestable llamada Taq, que no resulta destruida por las elevadas temperaturas a las que transcurre la PCR. La polimerasa Taq se fabrica con bacterias modificadas genéticamente (Encarta, 2008).

Los volúmenes de material asociados al análisis de recursos genéticos determinan el uso preferente de marcadores moleculares basados en PCR puesto que ellos requieren una menor cantidad de ADN y no requieren además de mayor infraestructura y experiencia molecular.

Aquellos marcadores moleculares basados en PCR permiten analizar una mayor cantidad de muestras en un menor tiempo, y presentan un mayor potencial de automatización analítica e informatización de la información generada (**Campos y Seguel, 2000**). Todas las técnicas que se describen a continuación presentan en común la utilización de la PCR, como sistema de amplificación in vitro de ADN:

### **2.6.3. Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)**

Esta metodología combina la amplificación por PCR de una secuencia conocida de ADN (un locus) usando partidores específicos, seguido de la digestión del amplificado con enzimas de restricción que permiten cortar el fragmento amplificado en algunos individuos y no en otros, detectando el

polimorfismo, éste es revelado en electroforesis, en gel de agarosa al ser teñido con bromuro de etidio (Araneda, 2004).

Los RFLPs proporcionan marcadores codominantes que se han utilizado en la realización de mapas de ligamiento, estudios de segregación, recombinación, paternidad, etc. Sin embargo, se trata de una técnica costosa y muy laboriosa, que precisa una gran cantidad de ADN y una información previa sobre la secuencia, por lo que está siendo desplazada por los marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (Jiménez y Collada, 2000).

#### **2.6.4. Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados al Azar (RAPD)**

Esta técnica usa un sólo partidor de secuencia arbitraria (típicamente de 10 bases o 10-mer) para amplificar el ADN (en un PCR ordinario se usan dos partidores), estos partidores se unen a sitios complementarios presentes en el ADN genómico bajo estudio. Si dos partidores se unen en sitios presentes en hebras opuestas, dentro de una distancia amplificable (normalmente de 2.500 bases) se amplifica un fragmento discreto. El número de fragmentos amplificados varía entre 1 y 10 por partidor. Los productos de la amplificación son separados mediante electroforesis y las bandas visualizadas, de diferente peso molecular representan diferentes loci (Araneda, 2004).

Como desventaja en esta técnica, aparece la inconsistencia de los datos. Diferentes condiciones de laboratorios con pequeñas alteraciones en los parámetros de amplificación, pueden dar origen a resultados diferentes. Esta desventaja se puede reducir logrando un alto grado de

estandarización de las condiciones de reacción y de amplificación, usando un control interno para asegurar la reproducibilidad de los productos de la amplificación; además del registro de las bandas nítidas y consistentes (Becerra y Paredes, 2000).

#### **2.6.5. Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados (AFLP)**

El procedimiento de esta técnica comienza con la digestión del ADN genómico de los individuos con enzimas de restricción que reconocen 4 y 6 bases de reconocimiento, lo cual genera fragmentos de tamaño preferentemente pequeño. Luego se ligan adaptadores de secuencia conocida a cada extremo y para el proceso de amplificación se usan partidores complementarios a estos adaptadores, manteniendo el sitio de restricción más un cierto número de nucleótidos (3 generalmente) que deben agregarse al extremo 3'. Finalmente, el proceso implica dos alternativas de detección de las bandas. La primera es la marcación radioactiva de los productos amplificados en la última etapa de amplificación, su separación en geles de poliacrilamida, secado del gel y su visualización en autoradiografías. La segunda alternativa usa la tinción directa del gel con nitrato de plata (Becerra y Paredes, 2000).

Una de las desventajas para la interpretación de los datos es el tiempo necesario para el análisis cuando se realiza en forma no automatizada (visual). Por otro lado, los loci de AFLP son tan reproducibles como los RFLPs, pues son prácticamente insensibles a las condiciones de la reacción, aunque ambas técnicas requieren de una buena calidad de ADN para el proceso de digestión con enzimas de restricción (Tohme *et al.* citados por Becerra y Paredes, 2000).

### 2.6.6. Número Variable de Repeticiones en Tandem (VNTRs)

Las VNTRs son secuencias repetidas en tándem un número variable de veces, como secuencias cortas (entre 10 y 100 pb) que pueden estar repetidas 5 veces en un lugar del cromosoma (locus) y estar repetida 4 veces en otro locus distinto y 7 veces en otra posición. El número de veces que está repetida varía de un lugar a otro del mismo cromosoma, también varía entre cromosomas distintos (Baerga, 2006).

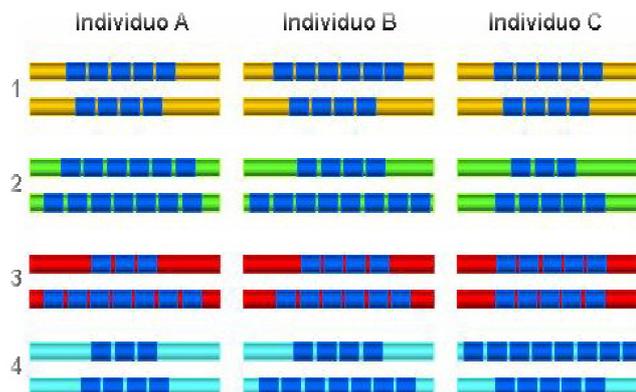


Figura 3. VNTRs: Cuatro pares de cromosomas de homólogos en tres individuos (Baerga, 2006).

Existen dos tipos de VNTRs los llamados “Minisatélites” y “Microsatélites” o SSR (secuencias simples repetidas). Los minisatélites y microsatélites difieren en el tamaño del motivo que se repite entre 15 y 100 pb para el primer caso y entre 1 y 6 pb para el segundo caso (Araneda, 2004).

Las secuencias de ADN de mini y microsátélites son dos categorías de secuencias repetidas que se presentan en eucariontes. Ellas se encuentran repetidas en tandem y dispersas a través del genoma representando muchos loci. Cada locus tiene distinto número de repeticiones variable, asociándose de esta manera a alelos específicos de alta variabilidad (Becerra y Paredes, 2000).

- *Minisatélites*: Estos marcadores fueron los primeros VNTR estudiados, en ellos el motivo repetido no siempre es idéntico y su uso fue inicialmente para pruebas de paternidad por “DNA fingerprint”. Esta es una metodología multilocus, es decir se detectan muchos loci que poseen el minisatelite a la vez, pero no se sabe en qué región del genoma se encuentran. La muestra de ADN genómico de cada individuo es digerida con enzimas de restricción, nuevamente los fragmentos son separados por tamaño en una electroforesis, transferidos a una membrana e hibridados con sondas que en este caso corresponden al motivo del minisatelite (“southern blot”). El producto final del “DNA fingerprint” es un patrón de bandas que es específico de un individuo (normalmente entre el 15 al 20% de las bandas son compartidas por dos individuos debido al azar). Las bandas reveladas por esta técnica tienen un patrón de herencia mendeliana, pues en promedio la mitad de las bandas son derivadas de cada progenitor (Araneda, 2004).

La técnica es de alta reproducibilidad, aunque requiere de un proceso de clonación previo de la sonda hipervariable, además de un ADN de alta calidad para el proceso de restricción y transferencia (“southern blot”), e hibridación con la sonda,

generalmente marcada radioactivamente, y finalmente exposición a una película de rayos-X (Becerra y Paredes, 2000).

- *Microsatélites o SSR*: Son regiones hipervariables, que se caracterizan por la repetición en “tándem” de 2 a 5 pares de bases (Ornella *et al.*, 2001).

La longitud variable de las repeticiones da lugar a muchos alelos en el locus de un microsatélite. Fallas en la replicación del ADN constituyen el principal mecanismo que genera tal diversidad de alelos por locus. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cada loci puede amplificarse individualmente utilizando oligonucleótidos específicos que reconocen regiones de secuencia única adyacentes a dichas repeticiones (Ornella *et al.*, 2001).

Las secuencias microsatélites están presentes en todas las células eucariotas y se ubican en loci específicos densamente distribuidos sobre los genomas, tanto en regiones codificantes como no codificantes (Cardle *et al.* citados Morales, 2002).

En cada genotipo la amplificación de loci específicos revela la presencia de uno o más alelos por locus, según el grado de ploidía de la especie y según sea el individuo heterocigota u homocigota. La identificación del individuo denominada huella digital o “fingerprint” queda descrita por el conjunto total de alelos obtenido para cada uno de ellos, llamado patrón alélico. La comparación de patrones alélicos, mediante coeficientes de similitud, permite establecer grupos de individuos con características génicas similares.

Dichos grupos, asociables a pedigree o a grupos heteróticos, suelen ser representados mediante un dendrograma (Pejic *et al.* citados por Morales, 2002).

El uso de microsatélites ha ido aumentando mediante la producción de bibliotecas de partidores y la secuenciación automática fluorescente que permiten el diseño de los partidores que rodean los microsatélites ([Brondani \*et al.\*](#) citados por Becerra y Paredes, 2000). Los fragmentos generados son separados en geles denaturantes de poliacrilamida y visualizados radioactivamente o por tinción con nitrato de plata (Becerra y Paredes, 2000).

George (*et al.* 2004), manifiestan que entre los marcadores moleculares, los microsatélites se han convertido en el marcador de elección para muchos análisis genéticos, pues combinan varias ventajas como son: codominancia, multialelismo, alta heterocigosidad, automatización y elevada reproducción (marcador de PCR), lo que deriva en un bajo costo por "data point".

El alto nivel de polimorfismo que detecta permite una discriminación precisa entre individuos altamente emparentados. Además de ser altamente polimórficos y poseer la capacidad para analizar un único locus de posición conocida en el cromosoma, los microsatélites usan cantidades mínimas de ADN (Becerra y Paredes, 2000 y Ornella *et al.*, 2001).

## 2.7. DIVERSIDAD GENÉTICA Y FITOMEJORAMIENTO

La biotecnología y la agrobiodiversidad van de la mano, la biotecnología ofrece herramientas para entender, conservar y usar los recursos genéticos, estos son fuente de genes para el mejoramiento de los cultivos, dentro y entre especies. El conocimiento de la agrobiodiversidad y el desarrollo agrícola adquieren, con el pasar de los tiempos mayor codependencia ya que, mientras que sin una agricultura apropiada los ecosistemas pueden ser transformados drásticamente; sin la biodiversidad, la agricultura no puede prosperar (Roca, S.f.).

Conocimientos sobre la diversidad genética y las relaciones entre las líneas puras de maíz son indispensables para identificar combinaciones prometedoras para la explotación de la heterosis y la creación de grupos heteróticos, para su uso como fuente de materiales en un programa de mejoramiento (Legesse *et al.*, 2006).

Con los sistemas convencionales de mejoramiento, el intento de combinar la selección simultánea de más y más rasgos de interés agronómico, tiende a provocar una pérdida total del objetivo del fitomejoramiento y un aumento en el número de ciclos de reproducción necesarios para generar un producto terminado. En cambio, el uso de marcadores moleculares ofrece el potencial para reunir las características objetivo en el mismo genotipo más precisamente, con menos pérdidas involuntarias y en un menor número de ciclos de selección (Yunbi y Crouch, 2008).

En la actualidad se han realizado gran cantidad de trabajos aplicando las ventajas de los marcadores moleculares, sobre todo microsatélites, pues aún antes de ser establecida la correlación entre uno o más SSRs y los loci que

controlen características de interés agronómico, la disponibilidad de una batería de microsatélites, por si sola, ya permite emprender inmediatamente una serie de estudios importantes para los programas de mejoramiento genético. Así tenemos que las aplicaciones a corto plazo incluyen, básicamente, la identificación y discriminación de individuos (fingerprints), información sumamente necesaria en estudios de identificación de los parentales de algunas poblaciones, control de cruzamientos, estudios de diversidad y distancia genética y, últimamente, en la identificación y protección de variedades patentadas (Amayo 2002).

Amplificaciones con microsatélites ha demostrado que éstos son más variables que isoenzimas, RFLP, AFLP y RAPD. Por ejemplo, en *Cucumis spp.* se encontró que 29 isoenzimas no mostraron polimorfismo entre dos genotipos comerciales (Perl-Treves *et al.*, citado por Becerra y Paredes 2000). Dentro del mismo género RAPD detectó un 38% de polimorfismo, mientras que los microsatélites detectaron un 71%, e incluso detectaron diferencias genéticas entre cultivares altamente emparentados que mediante otras técnicas no habían podido ser distinguidos (Katzir *et al.*, citado por Becerra y Paredes 2000).

Semejantes resultados fueron reportados en un análisis comparativo de similitud genética entre líneas endogámicas de maíz detectada por RFLPs, RAPDs, SSRs, y AFLPs, donde la información reportada por SSRs en cuanto a heterocigosis esperada y número de alelos promedio fue bastante alta, mientras que los más bajos niveles de polimorfismos fueron obtenidos con AFLPs (Pejic *et al.*, 1998).

Los SSR's como herramienta de estudio genético se han difundido en los trabajos investigativos de reconocidas instituciones a nivel mundial y con

especies comercialmente importantes, algunos ejemplos son: la caracterización genética en gran escala de trigo y maíz llevada a cabo por el CIMMYT (George *et al.*, 2004; Legesse *et al.*, 2006; Reif *et al.*, 2006, y Choukan *et al.*, 2006); el establecimiento de una nueva colección básica de *Solanum tuberosum subsp. andigena* integrada por 474 genotipos por parte del CIP (FAO, 2002); el estudio de subespecies de arroz del INIA y CENIAP en Venezuela (Arnao *et al.*, 2007); la identificación de germoplasma de papa en el Programa de Mejoramiento del INIA en Chile (Mathias *et al.*, 2007); las caracterizaciones de cacao nacional boliviano en el CATIE (Martínez, 2007); los estudios de diversidad genética de caña de azúcar en CENICAÑA (Ríasco *et al.*, 2003); el análisis genético de la colección de frijol común procedente de Ruanda realizada por el CIAT (Gonzales, 2008), entre otros.

En la región sudamericana, en cuanto a maíz, se destaca la labor de INTA en Argentina, donde se trabaja en la identificación de marcadores microsatélites aplicables al mejoramiento asistido: buscado resistencia genética al virus del Mal de Río (MRCV) y a *Fusarium sp.*, analizando poblaciones heteróticas de maíz y realizando caracterización molecular de germoplasma de maíz (Schlatter *et al.*, S.f.).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.3. CARACTERIZACIÓN AGROMORFOLÓGICA

##### 3.3.1. Ubicación del Lugar de Investigación

###### 3.3.1.1. Ubicación política

El ensayo de campo se situó en el lote “Mecánica” de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP, en el cantón Quevedo, provincia de Los Ríos.

###### 3.3.1.2. Ubicación geográfica

La Estación se encuentra a 120 m.s.n.m. en las siguientes coordenadas geográficas:

- 79° 27'42” de longitud Occidental
- 1°06' de latitud Sur

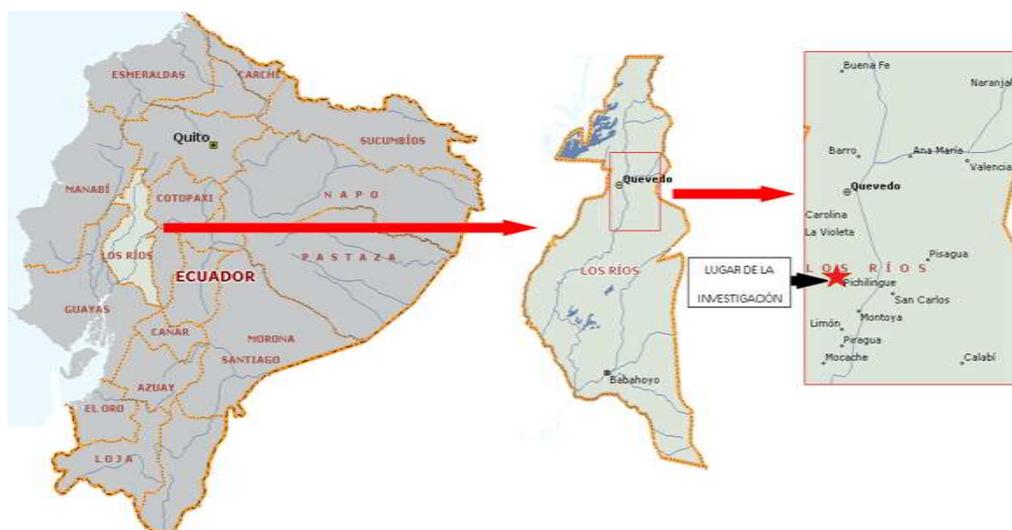


Figura 4. Ubicación de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP

### 3.3.1.3. Características climáticas

La Estación presenta las siguientes características:

- Precipitación: 2.000 mm al año, de los cuales el 90% cae en época lluviosa (enero a abril) y el resto en lluvias esporádicas durante la época seca (mayo a diciembre).
- Humedad relativa: 83%.
- Heliofanía: de 900 horas de sol al año.
- Temperatura promedio anual: 24,5°C.

### 3.3.2. Materiales

- Semilla de 49 accesiones
- Insecticida
- Flexómetro
- Regla de 30 cm
- Fundas de papel
- Balanza
- Estacas
- Calibrador
- Baldes
- Regla de 4 m
- Piola
- Detector Dickey John
- Grapadora
- Mascarillas
- Herbicidas
- Fertilizantes
- Bomba de mochila
- Glacines
- Libro de campo
- Espeque
- Letreros
- Motoguadaña
- Tarjetas de identificación
- Cámara fotográfica digital
- Calculadora
- Sacos
- Fundas de papel

### **3.3.3. Métodos**

#### **3.3.3.1. Diseño experimental**

##### **3.3.3.1.1. Tratamientos**

Originalmente fueron seleccionados 49 tratamientos para la investigación, que corresponden a líneas con alto nivel de endogamia (> 80% de homocigocis), finalmente 45 completaron el proceso de evaluación, tal como se detallada en el cuadro 2.

##### **3.3.3.1.2. Tipo de diseño**

Se utilizó un látice de 7x7, generado por el software ALPHAGEN a partir del algoritmo desarrollado por Paterson y Patterson (1984 citados por Barreto *et al.*, 1993).

##### **3.3.3.1.3. Repeticiones y bloques**

El ensayo contó con 7 bloques por repetición y 3 repeticiones

Cuadro 2. Germoplasma de Maíz utilizado en la caracterización agromorfológica

T	GENEALOGIA	ORIGEN	
		AÑO	SURCO
1	CLA-156-#	P-2008-A	3033
2	CLA-93-#	P-2008-A	3026
3	CLA-97-#	P-2008-A	3029
4	CML-163-#-#	P-2004-A	3112
5	CML-171-5#	P-2008-A	6032
6	CML-172-4#	P-2008-B	6031
7	CML-29-#-#-#	P-2004-B	6037
8	CML-294-2#	P-2006-B	6026
9	CML-299-#-#	P-2004-B	6039
10	CML-31-#-#	P-2004-A	3128
11	CML-403-#	P-2003-A	3042
12	CML-40-4#	P-2006-A	3050
13	CML-408-#-#	P-2004-B	6035
14	CML-422-#-#-#	P-2004-B	6038
15 <sup>#</sup>	CML 481	2008	CIMMYT
16 <sup>*</sup>	CML 404	2008	CIMMYT
17	CLO 3613	2008	CIMMYT
18	CLO 2450	2008	CIMMYT
19	L-(X)M-10-11-11-# POBLACION-A	P-2004-A	3017
20	FAMILIA-11 ♂ 1-14-1 POBLACION-B	P-2003-B	6007
21	FAMILIA-24-♂ 1-5-3-1-13 POBLACION-B	P-2006-B	6011
22	L-237-2-1-3-8# POBLACION A-1	P-2008-A	3013
23	L-257-2-2-6-4# POBLACION-A1	P-2006-B	6020
24	L-239-1-7-6-2-#-# POBLACION-B1	P-2004-A	3016
25 <sup>#</sup>	L-232-1-4-9-2# POBLACION-B1	P-2000-A	3190
26	L-16-13-8-5-# POBLACION-31	P-2002-B	6009
27	L-16-3-11-3-2# POBLACION-31	P-2007-B	6015
28	L-16-5-1-6-# POBLACION-31	P-2002-B	6006
29	L-23-2-8-1-#-# POBLACION-31	P-2003-A	3056
30	L-7-2-4-4-#-# POBLACION-31	P-2004-B	6030
31	L-7-4-9-5-#-# POBLACION-31	P-2003-A	3055
32	L-47-6-7-3-#-#-# ACROSS-7936	P-2004-B	6014
33	L-41-2-6-1-8# PICHILINGUE-7928	P-2006-B	6036
34	L-56-5-1-3-8# PICHILINGUE-7928	P-2008-A	3010
35	L-37-7-3-4-6# POZA RICA-8024	P-2007-A	3007
36	L-61-9-11-5-2-#-# POZA RICA 8024	P-2004-A	3009
37	L-63-3-1-6-5# POZA RICA-8024	P-2006-B	6033
38	L-1-2-11-7-# B-520	P-2006-A	3031
39	L-104-2-5-4-# B-521	P-2003-A	3054
40	L-70-3-8-8 B-523	P-2008-A	3004
41	L-44-6-1-10-2# B-530	P-2007-B	6012
42	L-44-6-9-14 B-530	P-2002-A	3004
43	L-18-2-1-4-2# FAMILIA-5	P-2007-B	6013
44	LP3a (m)	2008-B	PORTOVIEJO
45	LI4 (m)	2008-B	PORTOVIEJO
46	PHAEOSPHERIA 1AS2-4-1-1-1-1	2008-B	PORTOVIEJO
47	P79-RH-129-1-1	2008-B	PORTOVIEJO
48 <sup>+</sup>	SA 717-53	P-2000-A	3052
49	SA 717-64	P-2000-A	3063

T: Tratamiento; #: Descartado por excesiva pudrición de mazorcas; \*: Descartado por falta de floración; +: Descartado por falta de germinación

#### **3.3.3.1.4. Características del ensayo**

Distanciamiento de siembra: 20 cm entre plantas y 80 cm entre surcos

Longitud de surco: 5 m

Número de surcos: 1 surco por tratamiento

Número de bloques: 7 bloques por repetición

Área de parcela: 4 m<sup>2</sup>

Distanciamiento entre repeticiones: 2 m

Área total del ensayo: 1063.44 m<sup>2</sup> (25,2 m x 42,2 m)

incluido calles.

### 3.3.3.1.5. Croquis de campo

	REPETICION I							REPETICION II							REPETICION III						
<b>B7</b>	(1) 43	(49) 44	(33) 45	(44) 46	(21) 47	(48) 48	(16) 49	(31) 92	(49) 93	(12) 94	(32) 95	(22) 96	(5) 97	(2) 98	(19) 141	(16) 142	(40) 143	(22) 144	(23) 145	(28) 146	(14) 147
<b>B6</b>	(28) 42	(29) 41	(43) 40	(41) 39	(12) 38	(17) 37	(7) 36	(24) 91	(7) 90	(35) 89	(1) 88	(34) 87	(46) 86	(19) 85	(6) 140	(18) 139	(45) 138	(17) 137	(32) 136	(36) 135	(1) 134
<b>B5</b>	(35) 29	(13) 30	(6) 31	(14) 32	(10) 33	(5) 34	(38) 35	(10) 78	(3) 79	(41) 80	(45) 81	(20) 82	(16) 83	(42) 84	(20) 127	(29) 128	(38) 129	(9) 130	(34) 131	(26) 132	(49) 133
<b>B4</b>	(47) 28	(26) 27	(8) 26	(32) 25	(19) 24	(27) 23	(42) 22	(47) 77	(21) 76	(18) 75	(43) 74	(38) 73	(11) 72	(40) 71	(31) 126	(48) 125	(10) 124	(46) 123	(8) 122	(43) 121	(15) 120
<b>B3</b>	(37) 15	(2) 16	(30) 17	(18) 18	(20) 19	(46) 20	(23) 21	(39) 64	(29) 65	(27) 66	(23) 67	(15) 68	(6) 69	(44) 70	(7) 113	(5) 114	(47) 115	(44) 116	(37) 117	(3) 118	(4) 119
<b>B2</b>	(34) 14	(45) 13	(25) 12	(39) 11	(40) 10	(31) 9	(4) 8	(4) 63	(8) 62	(33) 61	(17) 60	(9) 59	(30) 58	(14) 57	(13) 112	(12) 111	(39) 110	(21) 109	(30) 108	(42) 107	(24) 106
<b>B 1</b>	(11) 1	(9) 2	(24) 3	(3) 4	(15) 5	(36) 6	(22) 7	(37) 50	(36) 51	(28) 52	(26) 53	(13) 54	(25) 55	(48) 56	(41) 99	(25) 100	(2) 101	(33) 102	(11) 103	(27) 104	(35) 105

B = Bloque.

Los números entre paréntesis representan la aleatorización de los tratamientos generada por el software ALPHAGEN.

Los números sin paréntesis representan a la posición de la parcela.

### **3.3.3.2. Análisis estadístico**

#### **1) Análisis de varianza**

Para precisar la variabilidad morfológica entre las accesiones en estudio con las variables cuantitativas, se utilizó las medidas de resumen estadísticas (valor máximo, mínimo, desviación estándar, media) y el coeficiente de variación del análisis de varianza utilizando la opción LATANOVA del paquete estadístico ALPHAGEN (Barreto *et al.*, 1993). Para el caso de las variables cualitativas, se analizó las modas y frecuencias.

#### **2) Análisis de componentes principales (ACP)**

Se analizó la contribución de cada una de las variables estudiadas a cada componente principal expresada en valores y vectores propios. El valor propio representa la varianza asociada con el componente principal que decrece a medida que se generan dichos componentes. Y el vector propio contiene los coeficientes de las combinaciones lineales de las variables originales. La mencionada información permitió conocer la relación existente entre las variables cuantitativas consideradas y la semejanza entre las accesiones. También seleccionar las variables cuantitativas más discriminatorias para limitar el número de mediciones en caracterizaciones posteriores (Franco e Hidalgo, 2003).

### **3) Valor discriminante de las variables**

Se identificó dentro del grupo de descriptores cuantitativos utilizados, aquellos que tienen el mayor valor discriminante y que permiten una eficiente identificación de la relación entre accesiones para un carácter específico y para el grupo de descriptores, a través de la cuantificación de la proporción de varianza explicada por cada variable original sobre los componentes seleccionados (del análisis de componentes principales).

### **4) Matriz de distancia y estructura taxonómica**

La valoración de la similitud taxonómica entre cada par de entradas se realizó mediante ponderación del coeficiente de distancia de Gower, utilizando el paquete estadístico InfoStat. La estructura taxonómica se examinó por medio del agrupamiento jerárquico de Ward (InfoStat, 2008).

Se elaboró dendograma con la información suministrada por la matriz de distancia genética, donde se mostró la relación en grado de similitud entre las accesiones. Visualmente se reconocen desde los grandes grupos, los subgrupos hasta llegar a los núcleos que representan la máxima similitud hallada en los tratamientos en estudio (Crisci y López, citados por Sánchez, 2002).

### 3.3.3.3. Variables medidas

Las variables (descriptores) han sido tomadas de la lista publicada por el IBPGR y el CIMMYT (1991), y del catálogo de recursos genéticos de maíces de altura ecuatorianos del INIAP (Yáñez *et al.*, 2003):

- *Altura de planta*: Promedio de la medida desde el suelo a la base de la panoja de cinco plantas por parcela tomadas al azar, registrado en centímetros después del estado lechoso.
- *Altura de inserción de la mazorca*: Promedio de las mediciones desde el suelo hasta el nudo de la mazorca más alta, en el estado lechoso, registrado en centímetros en cinco plantas al azar por parcela.
- *Días hasta la antesis ó floración masculina*: Número de días desde la siembra hasta que el 50% de las plantas liberaron polen.
- *Días hasta la emisión de estigmas ó floración femenina*: Número de días desde la siembra hasta que hayan emergido los estigmas del 50% de las plantas (estigmas de al menos 2 cm de longitud).
- *Número de hojas arriba de la mazorca más alta*: Cantidad de hojas desarrolladas por encima de la mazorca más alta,

incluyendo la hoja de la mazorca, registrado en cinco plantas tomadas al azar por parcela, después del estado lechoso.

- *Índice de macollamiento*: Número de macollos por planta, contados en el momento de floración, registrado en cinco plantas al azar por parcela.
- *Color del tallo*: Expresión de la coloración observada en el tallo, entre las dos mazorcas más altas, según su frecuencia y en base a la siguiente la escala: 1 Verde, 2 Púrpura y 3 Café
- *Tipo de panoja*: Se registrará en estado lechoso, en cinco plantas por parcela al azar, siguiendo la escala: 1 Primaria, 2 Primaria-secundaria, 3 Primaria-secundaria-terciaria.
- *Incidencia de cinta roja*: Porcentaje de plantas que presentaron los síntomas de la enfermedad como: entrenudos cortos, achaparramiento y coloración rojiza en las hojas.
- *Pudrición de mazorca*: Número de mazorcas afectadas por *Fusarium moniliforme*, del total de mazorcas cosechadas.
- *Cobertura de mazorca*: Registrada en las mazorcas de cinco plantas por parcela, siguiendo la escala: 1 buena, 3 regular, 5 mala.

- *Longitud de panoja*: Medida en centímetros desde la primera ramificación de la panoja hasta el final de la misma, en cinco plantas por parcela tomadas al azar después del estado lechoso (Figura 5).

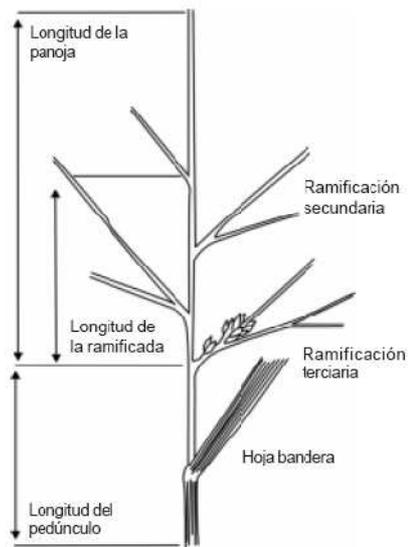


Figura 5. Longitud y tipo de panoja (IBPGR y CIMMYT, 1991).

- *Acame de Raíz*: Porcentaje de plantas acamadas con una inclinación de  $30^\circ$  o más a partir de la perpendicular en la base de la planta donde comienza la zona radicular.
- *Acame de Tallo*: Porcentaje de plantas con tallo roto debajo de la mazorca superior, antes de la cosecha.
- *Enfermedades foliares*: Calificación de la enfermedad en un rango de 1 (ausencia de la enfermedad) a 5 (infección muy severa) según la escala sugerida por el CIMMYT (1985) (figura 6), causada por “Tizón foliar” (*Exerohilum turcicum*,

*Exerohilum maydis*), “Roya” (*Puccinia sorghi*), “Mancha de asfalto” (*Phyllachora maydis*), “Mancha por curvularia” (*Curvularia lunata*), evaluada en las hojas de 5 plantas por surco, después de los 15 a 20 días de la emisión de los estigmas.

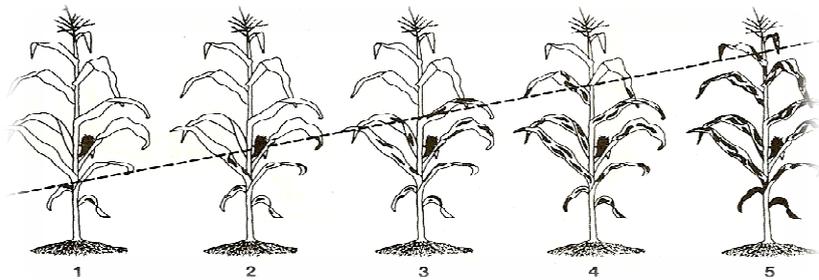


Figura 6. Escala para enfermedades foliares propuesta por el CIMMYT (1985).

- *Orientación de las hojas:* Disposición de las hojas después de la floración, según se observaron: 1 erectas, 2 colgantes, en cinco plantas por surco.
- *Longitud de mazorca:* Medida en cm desde el punto de inserción del pedúnculo con la mazorca hasta el final de la tusa, registrado en cinco mazorcas de las cuales se obtendrá un promedio (Figura 7).

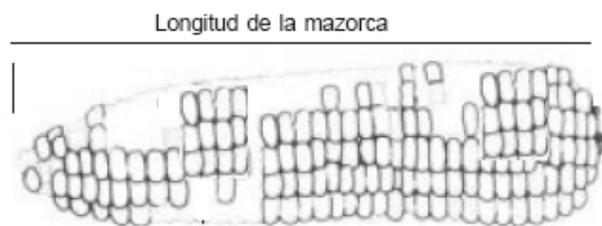


Figura 7. Longitud de la mazorca (IBPGR y CIMMYT, 1991).

- *Diámetro de la mazorca:* Promedio expresado en cm de los diámetros de cinco mazorcas, medido con un calibrador en un punto medio longitudinal y (Figura 8).

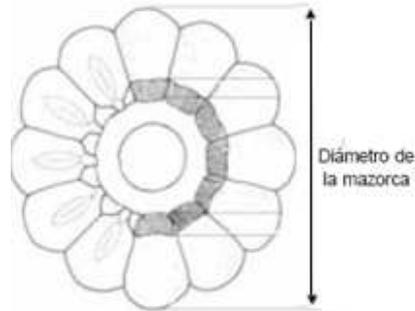


Figura 8. Diámetro de la mazorca (IBPGR y CIMMYT, 1991).

- *Número de hileras de granos por mazorca:* Promedio de la cantidad de hileras contadas en la parte central de cinco mazorcas.
- *Aspecto de la mazorca:* Calificación de la forma, tamaño, uniformidad de grano y de mazorca, utilizando una escala de 1 a 5, donde: 1 muy bueno, y 5 muy malo.
- *Forma de la mazorca más alta:* Se otorgó valores de: 1 cilíndrica; 2 cilíndrica-cónica; 3 cónica y 4 alargada.
- *Color de la tusa:* Identificación de los colores de la siguiente manera: 1 blanco; 2 rosa; 3 roja; 4 púrpura y 5 otro.

- *Porcentaje de desgrane:* Producto de la división del peso de semillas desgranadas de cinco mazorcas tomadas al azar, por el peso total de la mazorca (tusa y grano).
- *Índice de prolificidad:* Se obtiene dividiendo el número total de mazorcas cosechadas para el número de plantas existentes en cada surco.
- *Peso de mil granos:* Peso en gramos de una muestra de 1.000 granos limpios y sanos en una balanza de precisión digital.
- *Tipo de grano:* Se clasificó los granos en base a los siguientes tipos:
 

1 Harinoso	2 Semiharinoso	3 Dentado
4 Semidentado	5 Semicristalino	6
	Cristalino	
7 Reventador	8 Dulce	9 Tunicado
10 Ceroso		
- *Color del grano:* Se determinó el color usando una tabla cromática.
- *Longitud del grano:* Medida registrada con un calibrador expresada en cm, resultado del promedio de 10 granos consecutivos de una hilera, en el punto medio de la mazorca más alta.

- *Ancho del grano:* Se obtuvo un promedio de 10 granos consecutivos de una hilera, en la parte central de la mazorca más alta, valor que se expresará en cm, medido con un calibrador.
- *Grosor del grano:* Medido con un calibrador en 10 granos consecutivos, de la parte media de la mazorca más alta, se obtendrá un promedio y se expresará en cm.
- *Color de la flor femenina:* Registrado según la escala: 1 crema; 2 rosada y 3 blanca.
- *Rendimiento en kg/parcela:* Ajustado al 14%, del total de mazorcas cosechadas, calculado utilizando la siguiente fórmula:

$$R = \{(PC \times D \times MS) \times 1.000\} / 86 \times AP$$

Donde:

PC: Peso de campo (de todas las mazorcas cosechadas) en Kg

D: % de desgrane

MS: Materia seca (100 - % de humedad estimado en el detector Dickey John).

AP: Área de la parcela neta expresada en m<sup>2</sup>

#### **3.3.3.4. Métodos específicos de manejo del experimento**

- *Análisis de suelo:* Se tomó una muestra de suelo representativa del área donde se realizó la siembra del ensayo, la misma que

fue analizada por el Departamento de Manejo de Suelos y Aguas de la EET-Pichilingue del INIAP.

- *Preparación del suelo:* Se dio un pase de rastra y un pase de subsolado cruzado a una profundidad de 40 cm, previo a la siembra.
- *Semilla y siembra:* La semilla fue tratada con el insecticida Semevin (Thiodicarb), en dosis de 120cc/35kg de semilla. Se sembró con espeque colocando dos semillas por golpe.
- *Fertilización:* La aplicación de fertilizantes se realizó según las recomendaciones del análisis realizado por Departamento de Manejo de Suelos y Aguas de la EET-Pichilingue del INIAP:
  - Fósforo: 2 sacos de Superfosfato triple (46%  $P_2O_5$ ) por ha. incorporados con el pase de rastra.
  - Potasio: 2 sacos de Muriato de Potasio (60%  $K_2O$ ) por ha. incorporados con el pase de rastra.
  - Nitrógeno: 8 sacos de Nitrato de Amonio (33% N) por ha. aplicado en dos fracciones, la primera a los 15 días y la segunda a los 34 días después de la siembra.
- *Cruzamientos fraternales:* Previo a la emisión de los estambres en las flores femeninas (mazorcas), se realizó el glacinado (colocación de fundas) y se procedió de igual manera cuando el 50% de las anteras de las flores masculinas (panojas) estuvieron abiertas. Las fundas colocadas en las flores masculinas

quedaron cuidadosamente cerradas con una grapa, para recolectar la totalidad del polen liberado. Ambos procedimientos se realizaron en las primeras horas de la mañana. Una vez que los estambres de las flores femeninas alcanzaron al menos 4 cm de longitud, se procedió a la polinización planta a planta, utilizando para cada una el polen que produjo otra planta perteneciente al mismo surco. Estos cruzamientos se realizaron con la finalidad de incrementar y refrescar la semilla de las líneas evaluadas almacenada en el banco de germoplasma del Programa de Maíz de la EETP.

- *Control de malezas:* Se realizó control de malezas preemergente con Atrazina (Atrapac) para malezas de hoja ancha en dosis de 1,5kg/ha y Alaclor (Nudox) para control de malezas de hoja angosta en dosis de 2 l/ha. El control de maleza post emergente se efectuó únicamente con deshierba manual.
- *Controles fitosanitarios:* Se aplicó un “cebo” constituido por arena e insecticida (clorpirifos) en razón de 1cc/lb de arena, para el control del Gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), en cada planta, la cantidad aplicada dependía de la presencia del insecto.
- *Cosecha:* Se realizó de forma manual, al momento de la madurez fisiológica del cultivo.

### 3.4. CARACTERIZACION MOLECULAR

#### 3.4.1. Ubicación del Lugar de Investigación

##### 3.4.1.1. Ubicación política

La extracción y genotipaje de ADN del germoplasma se realizó en el laboratorio del Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, ubicada en el cantón Mejía de la provincia de Pichincha.

##### 3.4.1.2. Ubicación geográfica

La EE-Santa Catalina del INIAP se encuentra a 2750 m.s.n.m. en las siguientes coordenadas:

- 00° 23' latitud sur
- 78° 31' longitud oeste



Figura 9. Ubicación de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP.

### 3.4.1.3. Características climáticas

- Temperatura media: 16°C
- Precipitación: 1.250 mm
- Humedad relativa: 78%
- Heliofanía: 5,3 horas sol/día

### 3.4.2. Materiales

#### 3.4.2.1. **Reactivos**

- Tris HCl
- Tartrazina
- NaCl
- dNTP's
- Agarosa
- TAE 10X
- CIA
- EDTA
- PVP
- CTAB 1X
- MgCl<sub>2</sub>
- Bromuro de etidio
- B-mercaptoetanol
- Blue juice
- 5X PCR buffer
- Metabisulfito de sodio
- Primers (*Anexo I*)
- Taq polimerasa
- Agua ultrapura
- Aceite mineral
- Marcador de peso molecular
- Isopropanol

### **3.4.2.2. Materiales**

- Flotadores
- Parafilm
- Pipetas
- Maceradores
- Embudos
- Hielo
- Papel filtro
- Germoplasma de maíz (cuadro 3)
- Placas PCR
- Erlenmeyers
- Vasos de precipitación
- Puntas 1 ml, 200 ul y 1000 ul
- Tubos eppendorf
- Papel absorbente

### **3.4.2.3. Equipos**

- Baño maría
- Centrífuga
- Vórtex
- Sorbona
- Microestufa
- Refrigerador
- Incubadora
- Congelador
- Sellador de placas
- Termociclador
- Horno microondas
- Cámaras electroforéticas
- Fotodocumentador digital
- ADN Analyzer LI-COR 4300
- Cámara de UV
- Balanza analítica

Cuadro 3. Accesiones de maíz utilizadas en la caracterización molecular

T	GENEALOGÍA	ORIGEN	
		AÑO	SURCO
1	CLA-156-#	P-2008-A	3033
2	CLA-93-#	P-2008-A	3026
3	CLA-97-#	P-2008-A	3029
4	CML-163-#-#	P-2004-A	3112
5	CML-171-5#	P-2008-A	6032
6	CML-172-4#	P-2008-B	6031
7	CML-29-#-#-#	P-2004-B	6037
8	CML-294-2#	P-2006-B	6026
9	CML-299-#-#	P-2004-B	6039
10	CML-31-#-#	P-2004-A	3128
11#	CML-403-#	P-2003-A	3042
12	CML-40-4#	P-2006-A	3050
13#	CML-408-#-#	P-2004-B	6035
14	CML-422-#-#-#	P-2004-B	6038
15#	CML 481	2008	CIMMYT
16	CML 404	2008	CIMMYT
17#	CLO 3613	2008	CIMMYT
18#	CLO 2450	2008	CIMMYT
19#	L-(X)M-10-11-11-# POBLACION-A	P-2004-A	3017
20	FAMILIA-11 ♂ 1-14-1 POBLACION-B	P-2003-B	6007
21	FAMILIA-24-♂ 1-5-3-1-13 POBLACION-B	P-2006-B	6011
22	L-237-2-1-3-8# POBLACION A-1	P-2008-A	3013
23	L-257-2-2-6-4# POBLACION-A1	P-2006-B	6020
24#	L-239-1-7-6-2-#-# POBLACION-B1	P-2004-A	3016
25#	L-232-1-4-9-2# POBLACION-B1	P-2000-A	3190
26	L-16-13-8-5-# POBLACION-31	P-2002-B	6009
27	L-16-3-11-3-2# POBLACION-31	P-2007-B	6015
28	L-16-5-1-6-# POBLACION-31	P-2002-B	6006
29	L-23-2-8-1-#-# POBLACION-31	P-2003-A	3056
30	L-7-2-4-4-#-# POBLACION-31	P-2004-B	6030
31	L-7-4-9-5-#-# POBLACION-31	P-2003-A	3055
32	L-47-6-7-3-#-#-# ACROSS-7936	P-2004-B	6014
33	L-41-2-6-1-8# PICHILINGUE-7928	P-2006-B	6036
34	L-56-5-1-3-8# PICHILINGUE-7928	P-2008-A	3010
35	L-37-7-3-4-6# POZA RICA-8024	P-2007-A	3007
36	L-61-9-11-5-2-#-# POZA RICA 8024	P-2004-A	3009
37	L-63-3-1-6-5# POZA RICA-8024	P-2006-B	6033
38	L-1-2-11-7-# B-520	P-2006-A	3031
39	L-104-2-5-4-# B-521	P-2003-A	3054
40	L-70-3-8-8 B-523	P-2008-A	3004
41	L-44-6-1-10-2# B-530	P-2007-B	6012
42	L-44-6-9-14 B-530	P-2002-A	3004
43	L-18-2-1-4-2# FAMILIA-5	P-2007-B	6013
44	LP3a (m)	2008-B	PORTOVIEJO
45	LI4 (m)	2008-B	PORTOVIEJO
46	PHAEOSPHAERIA 1AS2-4-1-1-1-1	2008-B	PORTOVIEJO
47	P79-RH-129-1-1	2008-B	PORTOVIEJO
48#	SA 717-53	P-2000-A	3052
49#	SA 717-64	P-2000-A	3063

T: Tratamiento

#: Tratamiento descartado por falta de germinación

### 3.2.2. Métodos

#### 3.2.3.1. Procedimientos de laboratorio<sup>7</sup>

##### 1) **Extracción de ADN genómico**

Se sembró 10 semillas de cada una de las accesiones en estudio en el invernadero de la EE-Santa Catalina, luego de varios días se observó germinación en 39 tratamientos, los 10 restantes fueron resembrados en la EET-Pichilingue donde a los 3 días mostraron desarrollo de la radícula, así fueron trasladadas a la EE-Santa Catalina, después de dos días en el invernadero empezó el crecimiento de hojas, sin embargo en seguida fueron secándose progresivamente, hasta marchitarse por completo. La extracción de ADN del tejido foliar, siguió los principios establecidos por Colombo y modificados por Piedra 2004, basados en uso de CTAB 1X.

Para cada muestra se utilizó 750 µl de tampón de extracción más 12 µl de mercaptoetanol y 0,05 g de tejido macerado.

Una vez macerada la muestra, se incubó a baño maría a 65°C por una hora luego el tubo se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. Se rescató el sobrante en un nuevo tubo y se le adicionó CIA 24:1 en proporción 1:1.

---

<sup>7</sup> Morillo E., Miño G. 2009. Protocolos de Marcadores Moleculares del Departamento de Biotecnología del INIAP. Documento no publicado.

Esta solución se homogenizó y centrifugó a velocidad máxima por cinco minutos. Luego se descartó el precipitado para dar un lavado y centrifugado con etanol; posteriormente este último se eliminó y dejó secar el pellet formado a temperatura ambiente hasta el día siguiente, sobre papel absorbente. Al siguiente día se resuspendió el ADN con 100  $\mu$ l de solución tampón TE y se incubó en baño maría a 65°C, hasta que el pellet se disolvió.

## **2) Cuantificación de ADN**

El ADN se cuantificó por fluorescencia en minigeles de agarosa para lo cual, se acondicionó la cámara de electroforesis y el portageles. Se preparó un gel de agarosa al 1%. Una vez que estuvo disuelta la agarosa en el microondas, se dejó enfriar hasta alcanzar 60°C para verterlo en la cámara hasta que se solidificó, de modo que se pudo cubrir con amortiguador TAE 1X (quedó sumergido aproximadamente 5 mm bajo el amortiguador). Posteriormente se retiró los peines cuidadosamente evitando que se rompiera el gel. Para la preparación de muestras se mezcló 4  $\mu$ l de cada uno de los ADN a cuantificar más 1  $\mu$ l de Low DNA Mas Ladder; de éstas combinaciones se tomaron 2  $\mu$ l para cargar en cada pocillo del gel.

Se incluyó en el primer pozo el marcador de peso ADN Low Mas Ladder. Se tapó la cámara de electroforesis colocando los

electrodos en los extremos del aparato y se encendió la fuente de poder a 100 voltios durante 45 minutos.

Transcurrido el tiempo, se retiró el gel del portageles y se colocó en una bandeja con solución de bromuro de etidio por 15 minutos en agitación, luego se visualizó en el fotodocumentador digital (UVP Gel Documentation System) y se imprimió una fotografía del gel en papel térmico. La lectura de las bandas se realizó visualmente y el tamaño y concentración se calculó en función del marcador de peso molecular. Sobre la base de estas determinaciones, la concentración de ADN de cada una de las accesiones se estandarizó diluyendo en tampón TE 0,1 M Tartrazine hasta lograr una concentración final de 2,5 ng/ $\mu$ l.

### **3) Verificación del ADN**

Para comprobar la calidad del ADN extraído se realizó una prueba de amplificación con RAPD's, y se preparó una mezcla con los reactivos descritos a continuación (cantidades para una reacción):

- Agua: 2,30  $\mu$ l
- 5x PCR buffer: 2,20  $\mu$ l
- Primers: 0,40  $\mu$ l
- dNTP's: 0,40  $\mu$ l
- Taq polimeraza: 0,13  $\mu$ l

Para configurar la verificación del ADN en el termociclador se utilizó el siguiente protocolo:

Cuadro 4. Programa del termociclador.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	5 minutos
2	94	30 segundos
3	42	1 minutos
4	72	2 minutos
5	40 ciclos del paso 2 al 4	
6	72	7 minutos
7	10	5 minutos

Al final se visualizó el resultado en un gel de agarosa al 2,5%, luego de teñirlo en bromuro de etidio.

#### 4) PCR para microsatélites

Se utilizaron 13 primers Phi, previamente probados en el laboratorio de Biotecnología de la EE-Santa Catalina del INIAP, y dieron los mejores resultados bajo las siguientes condiciones (cuadro 5, 6 y 7):

Cuadro 5. Combinación de primers microsatélites.

Combinación	Primers	Fluorescencia
Dúplex	Phi-072 / Phi-031	700
Dúplex	Phi-011 / Phi-014	700
Dúplex	Phi-002 / Phi-057	700
Dúplex	Phi-015 / Phi-059	700
Dúplex	Phi-033 / Phi-083	700
Tríples	Phi-034 / Phi-041 / Phi-050	800

Cuadro 6. Mezcla de reactivos para cada reacción.

Reactivo	Cantidad
ADN (5 ng/ $\mu$ l)	4,000 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,720 $\mu$ l
PCR Buffer 5X	1,800 $\mu$ l
dNTP's (5 mM)	0,450 $\mu$ l
Primer F+R (20 mM) 1 y 2	1,800 $\mu$ l
Taq Gotaq promega (5 U/ $\mu$ l)	0,054 $\mu$ l
Agua ultra pura	0,176 $\mu$ l
Volumen final	9,000 $\mu$ l

Cuadro 7. Programa configurado para el termociclador.

Paso	Temperatura ° C	Tiempo
1	94	5 minutos
2	94	45 segundos
3	56	1 minutos
4	72	2 minutos
5	30 ciclos del paso 2 al 4	
6	72	7 minutos
7	10	5 minutos

### 5) Amplificación de loci microsatélites

La caracterización se realizó en el sistema DNA ANALYZER LI-COR 4300, cuya técnica se basa en la electroforesis en gel de acrilamida del ADN que se amplifican con dos primers, uno de ellos marcado con un fluoróforo que se excita a 685 nm (“IRD 700”) y el otro a 785 nm (“IRD 800”).

Los fragmentos amplificados fueron desnaturalizados y renaturalizados entre ellos frente a un control, de manera que en las posiciones donde existían los polimorfismos no había complementariedad total de las dos cadenas y se formaron bucles u horquillas.

Un posterior tratamiento con nucleasas rompió las cadenas en los puntos desapareados generándose dos fragmentos por cada corte, uno con marcaje IRD 700 y el otro con marcaje IRD 800. Dichos fragmentos, cuya suma de tamaños debe ser igual al tamaño del fragmento amplificado de partida, fueron separados electroforéticamente y detectados simultáneamente generándose dos imágenes del gel durante la electroforesis, una por cada fluoróforo empleado, que se procesan en software convencionales de tratamiento de imágenes.

La superposición de ambas imágenes hace que la identificación del polimorfismo sea muy exacta, eliminando prácticamente la posibilidad de falsos positivos. El DNA Analyzer 4300 LI-COR llevó a cabo los procesos de desnaturalización, renaturalización, tratamiento con nucleasas y análisis electroforético de los ADN.

El equipo contiene un servidor interno que permite operar y configurar el proceso, a través de un navegador de Internet o LI-COR Application Software y dispone de Software Saga-GT para la automatización, gestión de proyectos, puntuación de alelos, y la transferencia automática de datos a una base de datos Oracle.

Protocolo:

- Configurar el experimento en el Project Manager para crear el proyecto
- Crear el gel y los siguientes componentes en forma consecutiva: Ladders, locus, ADN.
- Crear el lugar donde se va a colocar el ADN, para lo cual se designará un casillero a cada muestra.
- Colocar los vidrios sobre un soporte y verter con la jeringa el gel. Retirando las burbujas con un alambre.
- Verter 0,25 mm de gel usando espaciadores.
- Insertar el peine para el gel para formar una depresión en la membrana durante la polimerización, posteriormente retirarlo.
- Eliminar cualquier exceso de poliacrilamida
- Instalar la parte superior del tanque de amortiguación y colocar el gel armado.
- Llenar la parte superior e inferior con TBE buffer a la línea de llenado de los tanques.
- Colocar la parte superior e inferior del depósito de amortiguación de las tapas en los cubos
- Utilizar un navegador de Internet para iniciar una nueva corrida utilizando los parámetros configurados (previamente denaturar las muestras de ADN).
- Cargar 0,5  $\mu$ l de cada muestra con “blue stop” en cada pocillo.

- Después de la pre-corrída enjuagar abundantemente a través de los canales realizados por el peine, asegurándose de que no haya acrilamida.
- Abrir el proyecto configurado para hacer correr el gel creado.

Con cada primer se preparó una solución (cuadro 8) que se aplicó al termociclador para la reacción de la PCR (cuadro 9).

Cuadro 8. Mezcla de reactivos para una reacción de amplificación en PCR.

Reactivos	Cantidad
Agua libre de nucleasas NFW	2,65 $\mu$ l
BUFFER PCR BOB´S	1,00 $\mu$ l
dNTP (5 mM)	0,40 $\mu$ l
M13 FW Primer (700/800)	0,30 $\mu$ l
RV (SSR)	0,30 $\mu$ l
$\mu$ l FW (+M13)	0,20 $\mu$ l
Taq	0,15 $\mu$ l
ADN (3ng/ $\mu$ l)	5,00 $\mu$ l

Cuadro 9. Programa configurado de 29-33 ciclos para el termociclador.

Temperatura	Tiempo	Observación
94 °C	4 minutos	(inicial)
94 °C	50 minutos	
Ta °C	1 minuto	(T° según el primer)
72 °C	50 minutos	
71 °C	4 minutos	(extensión final)

### **3.2.3.2. Análisis estadístico**

#### **1) Interpretación de imágenes (geles) y resultados del DNA Analyzer 4300 LI-COR**

El software SAGA-GT, permitió la gestión de genotipado automático con algoritmos tipo “allele fingerprinting” de autoaprendizaje, no susceptibles a error por la presencia de bandas sombra. Una vez obtenidos los resultados se realizó la interpretación y análisis de los resultados obtenidos a partir de la corrida del gel. El análisis se configuró en base a las características del experimento realizado, verificando las bandas presentes y ausentes, haciendo un scoring del gel, y reportando estos datos a una matriz que permite obtener datos en forma de texto (archivo tipo xls).

#### **2) Parámetros de diversidad genética clásica**

Debido a la naturaleza codominante de los microsatélites se calcularon las frecuencias alélicas por locus y porcentaje de homocigocidad, dado que son líneas de alto grado de endogamia (Belkhir *et al.*, citados por Morales, 2003) y el índice de contenido polimórfico (PIC), el cual expresa el grado de polimorfismo capaz de detectar un determinado marcador molecular, a fin de establecer si los marcadores seleccionados proporcionaron información suficiente para la discriminación del germoplasma, según la fórmula:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^N p_i^2$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia alélica del  $i$ -ésimo alelo, y  $N$  el número de alelos observados.

### 3) **Análisis de conglomerados (UPGMA)**

Se realizó el agrupamiento jerárquico de las accesiones en estudio usando un dendograma, mediante el método de encadenamiento promedio o UPGMA (unweighted pair-group method using an arithmetic average), que toma el promedio de todos los objetos en un conglomerado (centroide). Para representar al conglomerado y medir las distancias entre objetos o conglomerados con respecto a dicho centroide (InfoStat, 2008).

### 4) **Similitud genética**

La similitud genética entre cada par de accesiones se calculó a través del coeficiente de similitud de Jaccard, útil para enfatizar la posesión de los atributos, es decir las situaciones (1,1); (1,0) y (0,1). Entre los valores que se obtienen, el valor de máxima similitud es 0 y el valor de 1 de mínima similitud (InfoStat, 2008 y Franco e Hidalgo, 2003).

## **5) Análisis de componentes principales**

Con la finalidad de visualizar la estructuración de la diversidad genética, se realizó el análisis de componentes principales, que indicará cuales marcadores moleculares explican la diversidad total, que fracción de la diversidad es explicada y la relación de estos factores.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERIZACIÓN AGROMORFOLÓGICA

Se descartaron del análisis estadístico de agrupamiento seis variables (cuatro cuantitativas y dos cualitativas) de las 32 evaluadas en campo, siendo estas: color de tallo, por ausencia de variabilidad; acame de raíz y de tallo debido a que fuertes vientos derribaron gran cantidad de plantas; índice de macollamiento, por falta de macollos, cobertura de mazorca, por daños efectuados por insectos *Heliothis zea* a las brácteas de las mazorcas y rendimiento, debido a que todos los factores anteriores afectaron al mismo.

Se excluyeron del análisis estadístico cuatro tratamientos de los 49 considerados originalmente: CML 481 y L-232-1-4-9-2≠ Pob-B1 por pudrición de mazorcas, CML 404 por ausencia de floración y SA 717-53 por falta de germinación.

#### 4.1.1. Variabilidad Morfológica

En el cuadro 10 se presentan los parámetros estadísticos generales de las variables cuantitativas evaluadas en las accesiones de maíz. Los resultados de cada accesión con respecto a las 18 variables cuantitativas y 8 variables cualitativas evaluadas se muestran el anexo 2 y 3, respectivamente.

Los mayores niveles de variabilidad se presentan en las variables de: incidencia de Cinta roja con 124,78% de coeficiente de variación,

podrición de mazorca e índice de prolificidad de mazorcas con valores de 46,95 y 33,38%, respectivamente.

Las variables de mayor homogeneidad fueron los días a la floración, pues registraron los valores más bajos en cuanto a coeficiente de variación, con valores de 8,77% la floración femenina, y 7,72% la floración masculina.

Cuadro 10. Parámetros estadístico resumen de las variables cuantitativas evaluadas en 45 accesiones de maíz en la EET Pichilingue, en el 2009.

Variabes	n	Desviación estándar	Coficiente de variación (%)	Probabilidad F%
Floración femenina	45	4,94	8,77	1,00
Floración masculina	45	4,29	7,72	1,00
Longitud de panoja	45	4,47	13,56	1,00
Hojas sobre la mazorca	45	0,65	9,72	1,00
Altura de planta	45	28,50	15,11	1,00
Altura de mazorca	45	16,17	17,39	1,00
Roya	45	0,35	20,83	1,00
Curvularia	45	0,31	11,43	n.s.
Tizón Foliar	45	0,38	10,67	1,00
Mancha de Asfalto	45	0,49	32,81	1,00
Cinta roja	45	0,67	124,78	1,00
Pudrición de mazorcas	45	2,81	46,95	1,00
Prolificidad	45	0,24	33,38	1,00
Longitud de mazorca	45	2,56	21,32	1,00
Diámetro de mazorca	45	0,54	15,59	1,00
Hileras por mazorca	45	1,25	10,66	1,00
Longitud del grano	45	0,13	15,04	1,00
Ancho del grano	45	0,08	9,35	1,00
Grosor del grano	45	0,06	12,74	5,00
Porcentaje de desgrane	45	11,13	17,83	1,00
Peso de mil granos	45	72,79	26,69	1,00

n.s.: No significativo

Se determinó la mayoría de las variables tienen resultados estadísticamente significativos a nivel del 1%, a excepción de la variable grosor de grano cuya significancia esta a nivel del 5%; en tanto que Curvularia no mostró diferencias estadísticas significativas entre las líneas de maíz en estudio.

Los promedios y modas de las variables cuantitativas y cualitativas (Cuadro 11 y 12) indican que las accesiones evaluadas desarrollaron flores femeninas y masculinas en promedio alrededor de los días 56 y 55 respectivamente, en las más precoces la floración tanto masculina como femenina se reportó a los 48 días, mientras que las más tardías lo hicieron a los 68 días para floración masculina y 66 días para floración femenina.

Un 93,3% de estas flores resultaron ser de color crema, en este aspecto tres accesiones marcaron la diferencia, presentando flores rosadas (anexo 3). Así también la mayoría de las accesiones presentaron panojas de tipo secundaria (84,4%) y un pequeño número de accesiones (3) presentaron panojas terciarias.

La altura de las plantas osciló entre los 115,3 y 252,5 cm, la altura de inserción de mazorca se observó desde 40,30 cm en uno de los tratamientos (anexo 2) y hasta los 127,60 cm en las plantas más altas.

El número de hojas sobre la mazorca contabilizadas en los tratamientos (por planta) fluctuó entre 5 a 8 hojas; la orientación de estas fue en su mayoría de tipo colgante.

Cuadro 11. Promedios registrados de las variables cuantitativas evaluadas en las accesiones de maíz, en la EET Pichilingue, en el 2009.

VARIABLES	n	Máximo	Mínimo	Media
Floración femenina (días)	45	66	48	56
Floración masculina (días)	45	68	48	55
Longitud de panoja (cm)	45	42	22,80	33
Hojas sobre la mazorca	45	8	5	6
Altura de planta (cm)	45	252,50	115,30	188,62
Altura de mazorca (cm)	45	127,60	40,30	93,00
Roya	45	2,80	1,30	1,70
Curvularia	45	3,20	1,90	2,76
Tizón Foliar	45	4,40	2,80	3,56
Mancha de Asfalto	45	3	0,90	1,50
Cinta roja	45	2	0	0,50
Pudrición de mazorcas	45	13	1	5,99
Prolificidad	45	1	0,10	0,71
Longitud de mazorca (cm)	45	16,90	5,70	12,01
Diámetro de mazorca (cm)	45	4,30	2,50	3,49
Hileras por mazorca	45	14	8	12
Longitud del grano (cm)	45	1,10	0,60	0,86
Ancho del grano (cm)	45	1	0,74	0,89
Grosor del grano (cm)	45	0,60	0,40	0,51
Porcentaje de desgrane	45	77	30	62,41
Peso de mil granos (g)	45	449,10	155,90	272,70

Cuadro 12. Modas de las variables cualitativas evaluadas en las accesiones de maíz, en la EET Pichilingue, en el 2009.

VARIABLES	N	Moda	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)
Color de flor	45	Crema	42	93,3
Tipo de panoja	45	Secundaria	38	84,4
Orientación de hojas	45	Colgantes	24	53,3
Aspecto de mazorca	45	4,5	9	20,0
Color de tusa	45	Blanca	41	91,1
Color de grano	45	Amarillo-naranja 30	13	28,9
Tipo de grano	45	Semicristalino	27	60,0
Forma de la mazorca	45	Cilíndrica cónica	31	68,9

La incidencia de enfermedades foliares (escala de 1 a 5) alcanzó el mayor grado de severidad con Tizón foliar, que tuvo valores de hasta 4,4 en el peor de los casos y 2,8 en las plantas menos afectadas; los daños causados por Roya y Curvularia fueron bastante similares. Estas enfermedades registraron niveles de 2,8 y 3,2 respectivamente en las accesiones con menos tolerancia y 1,3 y 1,9 en las líneas de maíz más tolerantes. De las enfermedades evaluadas, fue Mancha de Asfalto la que menos incidió en el ensayo, no se encontró plantas con grado de infección superior a 3 y 0,9 fue el mínimo valor observado. La evaluación de presencia de Cinta roja dejó como resultados valores de entre 0 y 2 por ciento de plantas con síntomas de la enfermedad.

El índice de prolificidad observado en los tratamientos fue de entre 1 mazorca por planta existente en el surco, a 1 mazorca por cada 10 plantas. La contabilización de mazorcas con pudrición fue evidente en todos los tratamientos, al menos 1 mazorca con *Fusarium* se encontró de entre las cosechadas y en las accesiones más afectadas se encontró hasta 13 mazorcas con daños causados por el hongo.

El tamaño promedio estas mazorcas fue de entre 5,7 a 16,9 cm de largo, 2,5 a 4,3 cm de diámetro, con 14 a 8 hileras de granos. El color de tusa blanco predominó con un 91%, por encima de las de color rojo (2 accesiones Poza Rica), rosada (1 accesión Poza Rica) y púrpura (1 accesión de la Pob-31).

El 20% de las mazorcas obtuvo una calificación de 4,5 (en escala del 1 al 5) en cuanto a aspecto de mazorca y la forma de mazorca cilíndrica cónica fue la más comúnmente observada.

Los granos de maíz representaron en promedio entre el 30% y 77% del peso total de las mazorcas (porcentaje de desgrane) y registraron longitudes dentro de un rango de 0,60 a 1,10 cm, ancho de 0,74 cm a 1,00 cm y grosor de 0,40 a 0,60 cm. En cuanto al color fueron bastante variados, se registraron en total 3 colores (amarillo, amarillo naranja, naranja), y entre estos 27 diferentes tonalidades, el color mas observado fue amarillo/naranja en tono 30, pues estuvo presente en 13 de los 45 tratamientos estudiados. Y en cuanto al tipo de grano, los semicristalinos con un 27% resultaron ser los de mayor frecuencia entre las accesiones.

#### **4.1.2. Análisis de Componentes Principales (ACP)**

El ACP indica que el primer y segundo componente en conjunto contienen más de la mitad de la varianza total (Cuadro 13), suman un 56%, con el 46% y 10% cada uno, el resto de la varianza queda distribuida diferencialmente y en orden descendente entre los restantes 19 componentes.

El alto porcentaje de la variación total explicada por los dos primeros componentes sugiere que estos contienen variables que discriminan más eficientemente a las accesiones de maíz.

Cuadro 13. Valores propios y proporción de la varianza explicada en el análisis de los componentes principales

Componentes	Valor propio	Varianza total explicada	
		Absoluta	Acumulada
1	9,7	0,46	0,46
2	2,04	0,10	0,56
3	1,47	0,07	0,63
4	1,28	0,06	0,69
5	1,1	0,05	0,74
6	0,9	0,04	0,78
7	0,85	0,04	0,82
8	0,69	0,03	0,85
9	0,6	0,03	0,88
10	0,55	0,03	0,91
11	0,48	0,02	0,93
12	0,37	0,02	0,95
13	0,28	0,01	0,96
14	0,22	0,01	0,97
15	0,15	0,01	0,98
16	0,13	0,01	0,99
17	0,08	3,90E-03	0,99
18	0,05	2,20E-03	1,00
19	0,04	1,80E-03	1,00
20	0,03	1,30E-03	1,00
21	0,01	6,60E-04	1,00

La selección del componente 1 y 2 para el análisis se efectuó según el criterio gráfico de Catell (citado por Franco e Hidalgo, 2003), que consiste en graficar el valor propio de los componentes en relación al porcentaje de la varianza correspondiente, para representar el decrecimiento de los primeros componentes en relación con los demás, tal como muestra la Figura 10:

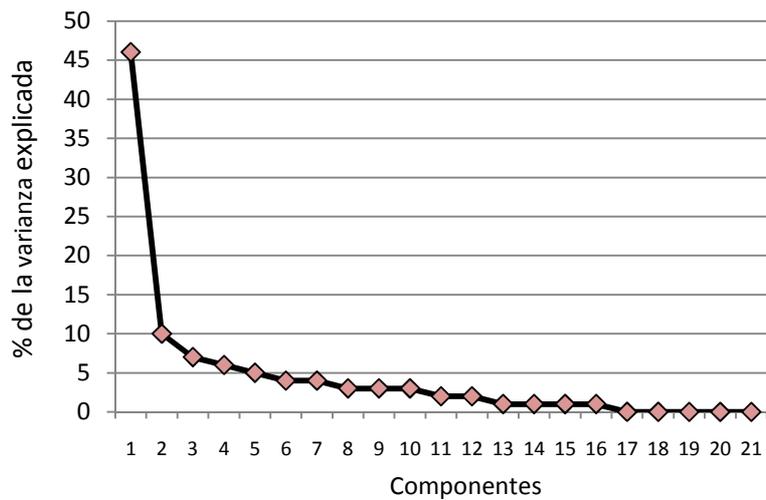


Figura 10. Representación gráfica de la proporción de la varianza explicada por cada componente principal.

La distribución de los coeficientes del primer vector propio y de correlación (Cuadro 14) muestra que peso de mil granos, longitud del grano y diámetro de mazorca son las variables que más contribuyeron en forma positiva al primer componente (e1 y CP1) con vectores de 0,29 para los tres casos indicados y con valores de correlación de 0,92; 0,91 y 0,90 respectivamente.

En sentido contrario días a la floración femenina con vector -0,24 y correlación de -0,76 y floración masculina con vector de -0,25 y correlación de -0,79 fueron las variables que más aportaron en forma negativa.

Cuadro 14. Vectores propios de los dos primeros componentes (e1 y e2) y correlación entre las variables originales y los dos primeros componentes (CP1 y CP2).

Variable	Vectores		Correlación	
	e1	e2	CP1	CP2
Floración femenina	-0,24	-0,27	-0,76	-0,39
Floración masculina	-0,25	-0,3	-0,79	-0,42
Longitud de panoja	0,22	0,1	0,67	0,14
Hojas sobre la mazorca	0,08	-0,4	0,26	-0,57
Altura de planta	0,26	-0,15	0,82	-0,21
Altura de mazorca	0,21	-0,17	0,64	-0,24
Roya	0,06	0,32	0,18	0,46
Curvularia	-0,01	0,46	-0,04	0,65
Tizón Foliar	0,02	0,19	0,08	0,27
Mancha de Asfalto	0,2	-0,15	0,61	-0,21
Cinta roja	0,17	0,1	0,53	0,14
Pudrición de mazorcas	0,09	0,29	0,28	0,41
Prolificidad	0,28	-0,01	0,88	-0,01
Longitud de mazorca	0,28	-0,11	0,86	-0,15
Diámetro de mazorca	0,29	-0,07	0,9	-0,1
Hileras por mazorca	0,22	0,02	0,7	0,03
Longitud del grano	0,29	-0,04	0,91	-0,05
Ancho del grano	0,27	-0,19	0,84	-0,27
Grosor del grano	-0,18	-0,26	-0,55	-0,37
Porcentaje de desgrane	0,25	0,1	0,78	0,15
Peso de mil granos	0,29	-0,16	0,92	-0,23

En el segundo componente (e2 y CP2) las variables de mayor incidencia positiva fueron Curvularia, Roya y Pudrición de mazorca con vectores de 0,46; 0,32 y 0,29 y correlaciones de 0,65; 0,46 y 0,41 respectivamente, por el contrario la mayoría de las variables contribuye de forma negativa al componente, sobre todo el número de hojas con vector de -0,40 y correlación de -0,57 y días a la Floración masculina y femenina con vectores de -0,27 y -0,30 y correlaciones de -0,39 y -0,42 respectivamente.

#### 4.1.3. Valor Discriminante de las Variables

En vista de que los componentes no están correlacionados entre sí es factible realizar el cálculo de la suma al cuadrado de la correlación que forma cada variable original con los dos componentes, para determinar su grado de discriminación. Los valores de los componentes 1 y 2 utilizados para el cálculo (tomados del cuadro 14), junto con los resultados ordenados en forma descendentemente se muestran a continuación:

Cuadro 15. Proporción de la varianza explicada por cada variable original sobre los dos primeros componentes principales.

Variabes	CP1	CP2	Proporción de la varianza
Peso de mil granos	0,92	-0,23	0,8993
Longitud de grano	0,91	-0,05	0,8306
Diámetro de mazorca	0,9	-0,10	0,8200
Floración masculina	-0,79	-0,42	0,8005
Ancho de grano	0,84	-0,27	0,7785
Prolificidad	0,88	-0,01	0,7745
Longitud de mazorca	0,86	-0,15	0,7621
Floración femenina	-0,76	-0,39	0,7297
Altura de planta	0,82	-0,21	0,7165
Porcentaje de desgrane	0,78	0,15	0,6309
Hileras por mazorca	0,7	-0,03	0,4909
Longitud de panoja	0,67	0,14	0,4685
Altura de mazorca	0,64	-0,24	0,4672
Grosor de grano	-0,55	-0,37	0,4394
Curvularia	-0,04	0,65	0,4241
Mancha de Asfalto	0,61	-0,21	0,4162
Hojas sobre la mazorca	0,26	-0,57	0,3925
Cinta Roja	0,53	0,14	0,3005
Pudrición de mazorca	0,28	0,41	0,2465
Roya	0,18	0,46	0,2440
Tizón	0,08	0,27	0,0793

Las variables de la parte superior del Cuadro 15 explican una mayor proporción de varianza, por lo tanto son consideradas como las más discriminatorias, tal es el caso de Peso de mil granos, la variable más discriminante, en segundo lugar Longitud de grano y luego Diámetro de mazorca. Por el contrario las variables fitosanitarias como incidencia de Cinta roja, Tizón foliar, Roya y Pudrición de mazorca resultaron ser las menos discriminantes.

#### **4.1.4. Matriz de Distancia y Estructura Taxonómica**

Se unificó los resultados de las variables cualitativas (modas) y cuantitativas (medias aritméticas ajustadas) para conformar una base de datos mixtos, que al ser analizada mediante el coeficiente de distancia de Gower dio como resultado una matriz simétrica (anexo 4) cuyos valores varían de 0 a  $\alpha$  (infinito), donde 0 es el indicativo de máxima similitud.

Los valores de la matriz generaron el dendograma correspondiente al agrupamiento de las accesiones, en el que de acuerdo con un nivel de significancia medio, es decir trazando una línea de referencia a una distancia próxima al 50% de la distancia máxima, es posible formar tres grupos claramente definidos (anexo 5), con un número de 10, 18 y 17 accesiones respectivamente, según se detalla en el cuadro 16.

Cuadro 16. Conglomeración en tres grupos de los 45 tratamientos de maíz evaluadas en la EET Pichilingue, en el 2009

CONGLOMERADO 1	CONGLOMERADO 2	CONGLOMERADO 3
CLA-156	CLA-97	CML-294-2
CLA-93	CML-163	FAM-24♂1-5 POB-B
CML-403	CML-171-5	L-237-2-1-3-8 POB A-1
CML-408	CML-172-4	L-257-2-2-6-4 POB-A1
CLO 3613	CML-29	L-239-1-7-6-2 POB-B1
CLO 2450	CML-299	L-16-3-11-3-2 POB-31
L-(X)M-10-11 POB-A	CML-31	L-7-4-9-5 POB-31
L-16-13-8-5 POB-31	CML-40-4	L-47-6-7 ACROSS-7936
LI4 (m)	CML-422	L-41-2-6-1 PICH-7928
P79-RH-129-1-1	FAM-11♂1-14 POB-B	L-56-5-1-3 PICH-7928
	L-16-5-1-6 POB-31	L-63-3-1-6-5 PR-8024
	L-23-2-8-1 POB-31	L-1-2-11-7 B-520
	L-7-2-4-4 POB-31	L-104-2-5-4 B-521
	L-37-7-3-4 PR-8024	L-70-3-8-8 B-523
	L-61-9-11-5 PR 8024	L-44-6-1-10-2 B-530
	LP3a (m)	L-44-6-9-14 B-530
	PHAEOSP 1AS2-4	L-18-2-1-4-2 FAM-5
	SA 717-64	

Los valores de la matriz de Gower reflejan que los conglomerados 1 y 2 están más relacionados entre sí, pues la media entre las distancias de las accesiones de ambos grupos es de 0,49 a diferencia de la distancia media de 0,59 entre los conglomerados 3 y 1 y de 0,51 entre el 2 y 3.

Cuadro 17. Promedios de las distancias de Gower calculadas entre las accesiones de maíz evaluadas en la EET Pichilingue, en el 2009.

Conglomerados	N° tratamientos	Media	Máximo	Mínimo
C1	10	0,44	0,54	0,37
C2	18	0,45	0,57	0,29
C3	17	0,44	0,62	0,32
C1-C2-C3	45	0,50	0,70	0,29
C1 X C2		0,49	0,64	0,39
C1 X C3		0,59	0,7	0,37
C2 X C3		0,51	0,67	0,38

La menor distancia calculada fue la resultante entre las accesiones CML-29 y CML-163 dentro del conglomerado 2, con un valor de 0,29; seguida por la distancia de 0,32 entre las accesiones L-7-4-9-5 Poblacion-31 y Familia-24 ♂ 1-5-3-1-13 Población-B del conglomerado 3. Por otro lado, las mayores distancias se registran entre los conglomerados 1 y 3, con las accesiones L-56-5-1-3-8 Pichilingue-7928 y CML-403 y así mismo con L-16-3-11-3-2 Poblacion-31 y CML-403, ambos casos con un valor de 0,7 (anexo 4).

#### **4.1.5. Incremento de Semillas**

Los procedimientos de autopolinización cruzada efectuados en el ensayo de campo generaron semilla fresca de 37 de las 49 líneas de maíz sembradas originalmente (Cuadro 20), por diferentes causas, como falta de polen, estambres no desarrollados, pudrición de granos y flores, etc., no se logró obtener semilla de las líneas:

- CLA-156-≠
- CML-299-≠-≠
- CML-31-≠-≠
- LP3a (m)
- CML 481
- CLO 2450
- SA 717-53
- FAM-11 ♂ 1-14-1 POB-B
- L-232-1-4-9-2≠ POB-B1
- L-7-4-9-5-≠-≠ POB-31
- L-47-6-7-3-4≠ ACROSS-7936
- PHAEOSPHAERIA 1AS2-4-1-1-1-1

Se polinizó un total de 974 plantas, de las cuales se obtuvo 7.516 g de semillas de maíz, con un promedio de 7,71 g de semillas por planta polinizada, que fueron debidamente etiquetados y almacenados en el Banco de Germoplasma del Programa de Maíz de la EET-Pichilingue.

Cuadro 18. Incremento de semillas de las líneas de maíz evaluadas en la EET Pichilingue, en el 2009

Accesión	Nº plantas polinizadas	Incremento de semillas (g)
CLA-93-≠	14	128
CLA-97-≠	27	204
CML-163-≠-≠	23	167
CML-171-5≠	20	227
CML-172-4≠	31	510
CML-29-≠-≠-≠	24	152
CML-294-2≠	14	475
CML-403-≠	12	64
CML-40-4≠	27	127
CML-408-≠-≠	14	27
CML-422-≠-≠-≠	18	8
CML 404	4	14
CLO 3613	11	83
L-(X)M-10-11-11-≠ POB-A	12	77
FAM-24-♂ 1-5-3-1-13 POB-B	16	93
L-237-2-1-3-8≠ POB A-1	36	540
L-257-2-2-6-4≠ POB-A1	19	143
L-239-1-7-6-2-≠-≠ POB-B1	28	155
L-16-13-8-5-≠ POB-31	37	32
L-16-3-11-3-2≠ POB-31	16	126
L-16-5-1-6-≠ POB-31	26	117
L-23-2-8-1-≠-≠ POB-31	9	115
L-7-2-4-4-≠-≠ POB-31	18	39
L-41-2-6-1-8≠ PICH-7928	27	518
L-56-5-1-3-8≠ PICH-7928	30	560
L-37-7-3-4-6≠ P R-8024	47	166
L-61-9-11-5-2-≠-≠ P R 8024	20	210
L-63-3-1-6-5≠ P R-8024	25	174
L-1-2-11-7-≠ B-520	31	560
L-104-2-5-4-≠ B-521	32	542
L-70-3-8-8 B-523	2	42
L-44-6-1-10-2≠ B-530	26	211
L-44-6-9-14 B-530	28	466
L-18-2-1-4-2≠ FAM-5	29	292
LI4 (m)	19	25
P79-RH-129-1-1	19	67
SA 717-64	16	60
TOTAL	974	7.516

## **4.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR**

De los 49 tratamientos sembrados, se observó germinación en solo 39 de ellos, los tratamientos CML-403-~~≠~~; CML-408-~~≠≠~~; CML-481; CLO-3613; CLO-2450; L-(X)M-10-11-11-~~≠~~ Pob-A; L-239-1-7-6-2-~~≠≠~~ Pob-B1; L-232-1-4-9-2~~≠~~ Pob-B1; SA 717-53; SA 717-64 fueron descartados de la caracterización molecular por falta de material vegetal.

### **4.2.1. Interpretación de resultados del DNA Analyzer 4300 LI-COR**

La matriz obtenida originalmente como producto del genotipado automático de las líneas de maíz con los 11 SSR's Phi en el DNA ANALYZER 4300 LI-COR se observa en el anexo 7.

### **4.2.2. Parámetros de Diversidad Genética Clásica**

Entre los 11 iniciadores microsatélites usados en el estudio de diversidad, 2 no respondieron a la amplificación (Phi-083 y Phi-034); se obtuvo también 14 puntos con datos perdidos, probablemente por fallos en la amplificación.

Los primers reportaron un total de 89 alelos (Cuadro 19), con un promedio de 8 alelos por locus, el más informativo de estos fue Phi072 con un total de 12 alelos y Phi-050 con dos alelos, fue el que reporto menos información.

Cuadro 19. Alelos reportados por los primers microsátélites

Primers	Phi 002	Phi 011	Phi 014	Phi 015	Phi 031	Phi 033	Phi 041	Phi 050	Phi 057	Phi 059	Phi 072
Alelos reportados	151	108	147	141	182	248	196	79	174	82	139
	155	109	148	143	183	249	199	83	175	83	140
	156	110	149	144	184	250	200		176	84	142
	159	116	157	150	185	251	202		177	85	145
	160	117	158	152	187	252	203		178	86	146
	161	118	159	153	188	253	204		186	95	148
	167	124	160	154		254			187	96	149
	168	126	161	155		255			193	102	150
			162	156		257				114	151
			163	157							152
			167								153
											154

En cuanto a las frecuencias alélicas (Cuadro 20), los más altos valores se obtuvieron con el alelo 83 del loci Phi-050 con una frecuencia de 0,9, como era de esperarse en vista de que sólo se presentaron dos alelos para este locus; y el alelo 185 correspondiente al locus Phi-031 que tiene una frecuencia de 0,82. En base a los resultados de las frecuencias alélicas por locus se calculó el contenido de información polimórfica o PIC (Cuadro 21) para cada marcador, el promedio general para los 11 iniciadores micorsatelites fue de 0,61. Los resultados individuales muestran que los primers Phi-015 con frecuencia 0,84, Phi-011 y Phi-059 ambos con 0,8 son los de mayor nivel de polimórfismo. Por el contrario el Phi-050 con PIC de 0,18 se puede considerar como un marcador monomórfico, ya que presento solo dos alelos y uno de ellos registro una frecuencia muy alta de 0,9.

Cuadro 20. Frecuencias alélicas reportadas por locus

Primers																						
Phi-002		Phi-011		Phi-014		Phi-015		Phi-031		Phi-033		Phi-041		Phi-050		Phi-057		Phi-059		Phi-072		
Alelo	F																					
151	0,01	108	0,26	147	0,03	141	0,09	182	0,03	248	0,03	196	0,03	79	0,10	174	0,01	82	0,03	139	0,03	
155	0,72	109	0,19	148	0,01	143	0,16	183	0,01	249	0,34	199	0,24	83	0,90	175	0,53	83	0,30	140	0,01	
156	0,06	110	0,18	149	0,08	144	0,21	184	0,03	250	0,15	200	0,36			176	0,01	84	0,05	142	0,03	
159	0,01	116	0,04	157	0,03	150	0,02	185	0,82	251	0,09	202	0,03			177	0,01	85	0,18	145	0,01	
160	0,01	117	0,24	158	0,21	152	0,12	187	0,01	252	0,11	203	0,03			178	0,03	86	0,03	146	0,05	
161	0,09	118	0,05	159	0,39	153	0,02	188	0,10	253	0,05	204	0,32			186	0,01	95	0,26	148	0,03	
167	0,03	124	0,01	160	0,03	154	0,26			254	0,05					187	0,03	96	0,08	149	0,18	
168	0,06	126	0,03	161	0,09	155	0,05			255	0,16					193	0,37	102	0,05	150	0,04	
				162	0,08	156	0,05			257	0,01							114	0,03	151	0,08	
				163	0,03	157	0,02														152	0,18
				167	0,03																153	0,22
																					154	0,13
n = 78		n = 74		n = 76		n = 43		n = 78		n = 74		n = 78		n = 78		n = 76		n = 74		n = 76		

n: número de individuos genotipados

F : Frecuencia alélica

Cuadro 21. PIC calculado para cada marcador microsatélite

Primers	Phi-002	Phi-011	Phi-014	Phi-015	Phi-031	Phi-033	Phi-041	Phi-050	Phi-057	Phi-059	Phi-072	Promedio general
PIC	0,47	0,80	0,78	0,84	0,31	0,81	0,71	0,18	0,59	0,80	0,45	0,61

Los niveles de homocigosis registrados por los microsatélites (Cuadro 22) fueron bastante altos. El marcador que dio como resultado más accesiones homocigotas fue Phi-031 con 38 individuos homocigotos de los 39 analizados, y el que mostró más heterocigotos fue Phi-015 con solo dos homocigotos entre 34 individuos.

Cuadro 22. Cantidad de genotipos homo y heterocigotos por cada primer microsatélite

Marcador	N° individuos	N° Homocigotos	N° Heterocigotos
PHI-002	39	26	13
PHI-011	37	21	16
PHI-014	38	37	1
PHI-015	34	2	32
PHI-031	39	38	1
PHI-033	37	34	3
PHI-041	39	37	2
PHI-050	39	31	8
PHI-057	38	30	8
PHI-059	36	33	3
PHI-072	38	30	8

Las accesiones con mayor porcentaje de homocigotos fueron la CLA-156-≠, CML-172-4≠, CML 404, L-257-2-2-6-4≠ POBLACION-A1, L-44-6-9-14 B-530, todas con 90,9 % de bandas homocigotas, por el contrario la línea más heterocigota fue la L-56-5-1-3-8 PICH-7928 con un porcentaje de 50% (Cuadro 23).

Cuadro 23. Porcentajes de homocigosis y heterocigosis reportados por cada accesión en la caracterización molecular.

Tratamiento	% Homocigosis	% Heterocigosis
CLA-156	90,9	9,1
CLA-93	81,8	18,2
CLA-97	81,8	18,2
CML-163	90,0	10,0
CML-171-5	81,8	18,2
CML-172-4	90,9	9,1
CML-29	70,0	30,0
CML-294-2	90,0	10,0
CML-299	81,8	18,2
CML-31	72,7	27,3
CML-40-4	63,6	36,4
CML-422	72,7	27,3
CML 404	90,9	9,1
L-16-3-11-3-2 POB-31	54,5	45,5
FAM-1 ♂ 1-14-1 POB-B	90,0	10,0
FAM-24♂ 1-5-3-1 POB-B	81,8	18,2
L-237-2-1-3-8 POB A-1	60,0	40,0
L-257-2-2-6-4 POB-A1	90,9	9,1
L-16-13-8-5 POB-31	81,8	18,2
L-16-5-1-6 POB-31	81,8	18,2
L-23-2-8-1 POB-31	81,8	18,2
L-7-2-4-4 POB-31	72,7	27,3
L-7-4-9-5 POB-31	72,7	27,3
L-47-6-7-3 ACROSS-7936	72,7	27,3
L-41-2-6-1-8 PICH-7928	70,0	30,0
L-56-5-1-3-8 PICH-7928	50,0	50,0
L-37-7-3-4-6≠ P R-8024	88,9	11,1
L-61-9-11-5-2 P R 8024	81,8	18,2
L-63-3-1-6-5≠ P R-8024	66,7	33,3
L-1-2-11-7-≠ B-520	70,0	30,0
L-104-2-5-4-≠ B-521	63,6	36,4
L-70-3-8-8 B-523	63,6	36,4
L-44-6-1-10-2≠ B-530	72,7	27,3
L-18-2-1-4-2≠ FAM-5	81,8	18,2
LP3a (m)	77,8	22,2
LI4 (m)	63,6	36,4
PHAEOSP 1AS2-4-1-1-1-1	81,8	18,2
P79-RH-129-1-1	81,8	18,2

#### 4.2.3. Análisis de Conglomerados

La representación gráfica de los resultados de la matriz de Jaccard (anexo 8) a través de un dendograma (anexo 9) mostró la conformación de tres grandes conglomerados (Cuadro 24), el de mayor tamaño, el conglomerado 3 está conformado por 18 accesiones, el número 1 contiene 13 accesiones, y el conglomerado 2, el más pequeño únicamente ocho accesiones.

Cuadro 24. Conglomerados formados mediante coeficiente de Jaccard.

CONGLOMERADO 1	CONGLOMERADO 2	CONGLOMERADO 3
CLA-156	FAM-24♂1-5-3 POB-B	CML-294-2
CLA-93	L-237-2-1-3-8 POB A-1	L-16-3-11-3-2 POB-31
CLA-97	L-257-2-2-6-4 POB-A1	L-47-6-7-3 ACROSS-7936
CML-163	L-16-13-8-5 POB-31	L-41-2-6-1-8 PICH-7928
CML-171-5	L-16-5-1-6 POB-31	L-56-5-1-3-8 PICH-7928
CML-172-4	L-23-2-8-1 POB-31	L-37-7-3-4-6 P R-8024
CML-29	L-7-2-4-4 POB-31	L-61-9-11-5-2 P R 8024
CML-299	L-7-4-9-5 POB-31	L-63-3-1-6-5 P R-8024
CML-31		L-1-2-11-7 B-520
CML-40-4		L-104-2-5-4 B-521
CML-422		L-70-3-8-8 B-523
CML 404		L-44-6-1-10-2 B-530
FAM-11♂1-14-1 POB-B		L-44-6-9-14 B-530
		L-18-2-1-4-2 FAM-5
		LP3a (m)
		LI4 (m)
		PHAEOS 1AS2-4-1-1-1-1
		P79-RH-129-1-1

#### 4.2.4. Similitud Genética

La matriz de similitud generada por el coeficiente de Jaccard mostró que las accesiones más emparentadas resultaron ser la L-70-3-8-8 B-523 y L-

44-6-1-10-2≠ B-530 con un valor de 0,46 de distancia, a diferencia de la L-1-2-11-7≠ B-520 que registró los mayores valores de distancia (0,99) frente a varias accesiones, sobre todo del grupo 1.

La media de las distancias entre grupos es menor entre los conglomerados 1 y 2 versus la distancia con las accesiones del conglomerados 3. Mientras que las accesiones más emparentadas dentro del mismo grupo son las del conglomerado 1 (Cuadro 25).

Cuadro 25. Distancias según coeficiente de Jaccard entre accesiones y conglomerados

Conglomerados	Nº tratamientos	Media	Máximo	Mínimo
C1	13	0,83	0,93	0,63
C2	8	0,84	0,96	0,72
C3	18	0,85	0,95	0,46
C1-C2-C3	39	0,88	0,99	0,46
C1 X C2		0,89	0,95	0,76
C1 X C3		0,91	0,99	0,77
C2 X C3		0,90	0,99	0,77

#### **4.2.5. Componentes Principales**

La distribución de la varianza total, entre los 150 componentes analizados es bastante baja para cada uno, el primero de ellos explica el 8%, el segundo el 7%, el tercero el 6%, y así sucesivamente (se omitió los datos de los componentes menos significativos en el Cuadro 26) hasta completar el 100% de la varianza. Por lo tanto podría afirmarse que no hay mayor diferencia en cuanto a la proporción de varianza explicada por cada componente pues esta se distribuye casi homogéneamente entre todos.

Cuadro 26. Resumen de los valores propios y proporción de la varianza explicada (resumen).

Componentes	Valor propio	Varianza total explicada	
		Proporción	Proporción acumulada
1	12,00	0,08	0,08
2	9,81	0,07	0,15
3	9,04	0,06	0,21
4	8,01	0,05	0,26
5	7,70	0,05	0,31
6	7,04	0,05	0,36
7	6,29	0,04	0,4
8	6,12	0,04	0,44
9	5,81	0,04	0,48
10	5,56	0,04	0,52
11	5,49	0,04	0,56
12	4,80	0,03	0,59
13	4,38	0,03	0,62
14	4,27	0,03	0,65
15	4,07	0,03	0,67
16	3,77	0,03	0,7
17	3,68	0,02	0,72
18	3,53	0,02	0,75
19	3,25	0,02	0,77
20	3,05	0,02	0,79
21	2,97	0,02	0,81
22	2,87	0,02	0,83
23	2,69	0,02	0,85
24	2,39	0,02	0,86
25	2,30	0,02	0,88
26	2,15	0,01	0,89
27	2,10	0,01	0,91
28	1,82	0,01	0,92
29	1,76	0,01	0,93
30	1,63	0,01	0,94
31	1,47	0,01	0,95
32	1,45	0,01	0,96
33	1,22	0,01	0,97
34	1,10	0,01	0,98
35	0,99	0,01	0,98
36	0,90	0,01	0,99
37	0,82	0,01	1
150	0,00	0	1

## V. DISCUSIÓN

El análisis de variabilidad morfológica permitió una estimación preliminar de la diversidad de las accesiones de las accesiones maíz, mediante el estudio de los coeficientes de variación de las variables cuantitativas registradas, el mismo que reflejó valores de entre 7,72% y 124,78%, lo que indica que existe un rango amplio de dispersión entre las accesiones para cada descriptor.

Se identificó a la incidencia de cinta roja como la variable de mayor grado de variabilidad, seguida por pudrición de mazorca. En sentido contrario las variables de días a la floración, tanto femenina como masculina, registraron mayor grado de uniformidad, pues la aparición (al menos el 50%) de las flores se dio prácticamente en los mismos días para las diferentes accesiones. Estos resultados coinciden con los del estudio de Ligarreto (*et al.*, 1998); Morales (2003) y Hernández (*et al.*, 2010), quienes manifiestan que las variables de floración son de igual forma las que presentan los valores más bajos de coeficiente de variación, dejando fuera de comparación las de sanidad, que no se evaluaron en dichos estudios.

Las características cualitativas mostraron ser poco variables, la mayoría de las modas registraron valores de frecuencia por encima del 50%, dos variables reportaron datos más diversos, estas fueron en primer lugar aspecto de mazorca con una moda de 4,5 repetida en un 20% de los tratamientos y color de grano, cuya moda fue el color amarillo/naranja tono 30, que se repitió en un 29% de las muestras. El color de flor fue la variable menos diversa, pues el 93,3% de las flores fueron de color crema, seguida del color de tusa, en la que predominó el color blanco.

El análisis de componentes principales resaltó el alto porcentaje de la variación total explicada por los dos primeros componentes, lo que sugiere que estos contienen las variables más discriminantes del estudio. En el primer componente, que explicó el 44% de la variación observada, se distinguió a las accesiones caracterizadas por mazorcas grandes, ya que registran mayor Peso de mil granos, Longitud de grano y Diámetro de mazorca, las mismas que además presentaron valores bajos en cuando a días a la Floración, tanto masculina como femenina. El signo negativo de las variables de floración, indica que estas caracterizan en sentido opuesto y esta proyección opuesta sobre el primer eje con respecto a las variables de tamaño de grano y mazorca, significa que las accesiones desarrollan mazorcas y granos de mayor tamaño, mientras más precoces sean a la floración.

Tomando como base la proporción de varianza explicada por cada variable original sobre los tres componentes seleccionados, se identificó como variables más discriminatorias a Peso de mil granos, Longitud de grano y Diámetro de mazorca, coincidiendo con lo afirmado por Ligarreto (*et al.*, 1998) en cuanto a que las variables con mayor poder discriminante son los caracteres de la mazorca. Al contrario incidencia de Cinta roja, Pudrición de mazorca, Roya y Tizón foliar son las menos discriminatorias, lo que revela la importancia de los caracteres de grano sobre los de resistencia a enfermedades.

El análisis morfoagronómico de las 45 accesiones permitió identificar tres grupos o morfotipos principales, en el primer y segundo grupo están contenidas casi todas las líneas originarias del CIMMYT, tales como las CML, CLA, CLO. El primer grupo sobre todo, se conforma casi exclusivamente de estas líneas, el segundo grupo es más variado pues también tiene unas cuantas accesiones de la Población 31 y Poza Rica adaptadas en la Estación Pichilingue, a diferencia del tercer grupo que contiene a todas

las líneas B-520, B-521, B-523, B-530 y PICHILINGUE 7928 generadas en la EET-Pichilingue.

Los grupos 1 y 2, tal como reflejaron las distancias entre las accesiones de estos dos grupos, son muy similares sobre todo en características como, floración tardía mayor rango de protandria, granos y plantas de menor tamaño. Las accesiones del grupo 3 se diferencian de los dos grupos anteriores por presentar floración más precoz, mayor rendimiento de grano, así como también mazorcas de mayor tamaño, es por eso que la medida de la distancia entre los morfotipos 3-2 y 3-1 son mayores que entre 1-2. Sin embargo, el grado de incidencia de enfermedades foliares y pudrición son algunas de las características que comparten los tres grupos, pues los valores promedio de las accesiones de cada grupo son muy similares (anexo 6).

En lo que respecta a la caracterización molecular, los marcadores reportaron un alto número de alelos, el promedio fue de 8 alelos por locus, superior a los datos de autores como Xia *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2004 que halló valores de 7,2 y 7,4; Warburton (*et al.*, 2005) con 4,9; Peji (*et al.*, 1998) con 6,8 alelos por locus y el promedio de 3,8 alelos de Legesse (*et al.*, 2006) en su estudio de maíces africanos con microsatélites.

Las frecuencias alélicas fueron en su mayoría menores al 50% por alelo, con excepción del 155 en el locus Phi-002, el 185 en el locus Phi-031 y el 175 en el locus Phi-057, lo que indica una distribución importante de genes en cada uno de los loci restantes.

En cuanto a heterocigosis, el microsatélite Phi-015 se destacó con la identificación de un 94% de individuos heterocigotos y en sentido contrario Phi-031 identificó más genotipos homocigotos (38 de 39 analizados), estos resultados se corresponden con el

bajo número de alelos reportados y desequilibrio en cuanto a distribución de alelos en el Phi-031.

Los marcadores Phi-011, Phi-014, Phi-015, Phi-033 y Phi-059, todos con valores de PIC superiores a 0,75 fueron los más discriminatorios, como resultado de un número de alelos reportados no menor a ocho cada uno y buena distribución de frecuencias. Es destacable el hecho de que el marcador Phi-011 fuera el más discriminatorio a pesar de no ser el que reportó más alelos.

El promedio PIC de los marcadores utilizados de 0,61 es similar al resultado de 0,59 reportado por George (*et al.*, 2004), y de Xia (*et al.*, 2005) de 0,64; un poco menor al dato de 6,8 indicado en el estudio de Pejic (*et al.*, 1998) y es mayor comparado con el de Legesse (*et al.*, 2006) de 0,55; esto refleja que los SSR's proporcionaron información suficiente para poder determinar la variabilidad genética en el germoplasma y son útiles para futuros estudios de caracterización genética.

Comparando individualmente, los valores de PIC registrados para los microsatélites Phi-041 (0,7) y Phi-057 (0,59) fueron ligeramente mayor al 0,7 y menor al 0,67, reportados por Ornella (*et al.*, 2001) los iniciadores Phi-002, Phi-011, Phi-014, Phi-015, Phi-033, Phi-059, reportaron más alelos y obtuvieron valores PIC mas altos que los reportados por George (*et al.*, 2004), a excepción de Phi-050 que en dicho estudio mostró un alelo más y PIC más alto.

La conglomeración de accesiones se generó principalmente en función del origen de las mismas, de forma similar al agrupamiento generado por la caracterización morfológica, pues el conglomerado 1 está formado casi exclusivamente por las accesiones provenientes del CIMMYT, las CML (9 accesiones) y CLA (3 accesiones),

contiene tan solo una línea de la Pob-B; el conglomerado 2 consta de casi todas las accesiones de la Pob-31 (5 accesiones), las de Pob-A1 (2 accesiones) y una de la Pob-B, líneas ya adaptadas por varios ciclos en la EET-Pichilingue; y por último en el conglomerado 3, que resultó ser el de mayor variedad, pues tiene a todas las líneas de maíz generadas en la EET-Pichilingue, tales como las B-520 (1 accesión), B-521 (1 accesión), B-523 (1 accesiones), B-530 (2 accesiones), PICHILINGUE-7928 (2 accesiones), más las líneas Poza Rica (3 accesiones) también adaptadas en esta Estación.

Se observó, en base a las distancias del coeficiente de Jaccard, que las accesiones CML y CLA mostraron ser genéticamente muy similares entre ellas. Por el contrario, la accesión de B-520 fue el genotipo menos emparentado entre todos los evaluados. Así mismo resulta interesante reconocer a la línea CML-294, por cuanto en las caracterizaciones molecular y morfológica, se distinguió notablemente de las demás CML, ubicándose en el grupo más distante a estas. También es de destacar el hecho de que ninguna de las accesiones de Pichilingue se halle en los conglomerados 1 y 2, de igual forma que las del CIMMYT se ubicaran todas en el conglomerado 1.

Que el nivel de similitud promedio entre grupos sea mayor que el promedio dentro de los mismos grupos, explicaría que la mayoría de las accesiones se hayan agrupado en función de su procedencia.

La diversidad observada, según los resultados del ACP de los datos moleculares, está distribuida entre los 150 componentes, por lo que se dice que el aporte de cada uno de los microsatélites es considerada de igual relevancia, ninguno prevalece mayormente sobre otro.

Los resultados de la fase molecular confirmaron y complementaron los resultados obtenidos en la fase de caracterización en campo, con la conformación de tres grupos, conformados de forma muy similar, sin lugar los datos de estos dos procesos serán muy útiles para establecer combinaciones con mayor potencial heterótico en la producción de híbridos de maíz.

## VI. CONCLUSIONES

- Las distancias de similitud entre las accesiones producto de la caracterización, tanto molecular como morfológica, definieron tres grupos, cuya conglomeración de líneas fue correspondiente con el origen de las mismas; en el grupo 1 se agruparon las líneas del CIMMYT, en el 2 las que han sido adaptadas en la Estación Pichilingue de variados orígenes y en el 3 las accesiones generadas en la Estación Pichilingue.
- Se halló diversidad genética entre las accesiones evaluadas, las líneas de maíz de los conglomerados 1 y 2 son más similares tanto morfológica como genéticamente, en comparación con las del conglomerado 3.
- Las líneas generadas en la estación Pichilingue, son genéticamente muy diferentes a las líneas del CIMMYT, inclusive a aquellas que llevan varios ciclos de adaptación en la Estación Pichilingue.
- Las variables cuantitativas más discriminantes fueron Peso de mil granos, Longitud de grano y Diámetro de mazorca, mientras que las de menor valor discriminatorio fueron las de incidencia de enfermedades foliares causadas por Tizón foliar (*Exerohilum turcicum*, *Exerohilum maydis*), Roya (*Puccinia sorghi*), Mancha de asfalto (*Phyllachora maydis*) y Mancha por *Curvularia* (*Curvularia lunata*).
- Las variables cualitativas con mayor grado de diversidad fueron Aspecto de mazorca y Color de grano, en contraste con las variables Color de tusa y flor que tuvieron bajos niveles de diversidad.
- La caracterización molecular reportó un valor PIC alto para los marcadores, además se reportaron numerosos alelos por locus, con frecuencias alélicas bien distribuidas

en la mayoría de los casos, lo que indica que los marcadores fueron eficientes en cuanto a la caracterización del material genético.

- Los SSR's Phi-011, Phi-014, Phi-015, Phi-033 y Phi-059 fueron los de mayor grado de discriminación entre las accesiones evaluadas.
- Se obtuvo semilla fresca de 37 de las 49 accesiones de maíz sembradas en el ensayo de campo para almacenar en el Banco de Germoplasma del Programa de Maíz de la EET-Pichilingue del INIAP.

## VII. RECOMENDACIONES

- Caracterizar las accesiones disponibles en el Banco de Germoplasma del Programa de Maíz de la EET-Pichilingue que no fueron incluidas en esta investigación con los marcadores y variables con mayor valor discriminatorio.
- Considerar la caracterización mediante microsatélites como información complementaria en los futuros estudios de líneas de maíz para la formación de híbridos.
- Considerar a las líneas menos similares genéticamente de este estudio para establecer combinaciones en pruebas futuras de formación de híbridos de maíz.
- Refrescar semillas de las accesiones que no produjeron granos en las labores de polinización realizados.
- Elaborar una base de datos con las características agromorfológicas registradas en el ensayo de campo de las accesiones evaluadas.

## VIII. RESUMEN

Atendiendo la necesidad de contar con recursos fitogenéticos debidamente caracterizados por parte de los mejoradores del Programa de Maíz de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP, se realizó el estudio de diversidad genética de 49 accesiones de maíz (*Zea mays L.*) en Quevedo de la provincia de Los Ríos, que comprendió una fase de caracterización agromorfológica en la que se evaluaron 26 variables cualitativas y cuantitativas y otra fase molecular empleando 11 marcadores microsatélites (SSR's).

En base a los resultados obtenidos en las dos fases de caracterización, se conformaron matrices de distancias a través de la ponderación de los coeficientes de Gower y Jaccard, con las que se visualizó la relación entre accesiones mediante dendogramas. Se identificaron tres grupos, conglomerados en forma muy similar en ambos casos, el primero conformado casi en su totalidad por accesiones procedentes del CIMMYT, el segundo con líneas de diferentes orígenes adaptadas por varios ciclos en la Estación Pichilingue y el tercero constituido por germoplasma generado en la Estación Pichilingue.

Las variables cuantitativas evaluadas registraron coeficientes de variación de entre 7% y 124%, las más discriminatorias fueron peso de mil granos, longitud de grano y diámetro de mazorca, por el contrario las cualitativas mostraron poca diversidad, la mayoría de sus modas tuvieron frecuencias por encima del 50%, a excepción de aspecto de mazorca y color de grano, que resultaron ser las más variables. El contenido de información polimórfica (PIC) de los marcadores fue en promedio de 0,61, con frecuencias alélicas mayoritariamente inferiores al 50%; los SSR's más discriminantes fueron Phi-011, Phi-014, Phi-015, Phi-033 y Phi-059, todos con valores de PIC superiores a 0,75.

## IX. SUMMARY

Given the need for plant genetic resources, appropriately characterized by the Maize Program of the Experimental Station of Tropical Pichilingue-INIAP, a research was conducted to study genetic diversity among 49 accessions of maize (*Zea mays L.*) in Quevedo of the province of Los Rios. The research included an agromorphological characterization phase, where 26 variables were evaluated and molecular phase, using 11 microsatellite markers (SSR's).

Based on the results of the two phases of characterization, distance matrices were formed through the weighting of the Gower and Jaccard coefficients. Three groups were identified, cluster very similar in both cases, the first one consists almost entirely of accessions from CIMMYT, the second whit lines of different origins adapted by several cycles in Pichilingue Station and the third consists of germplasm generated in Pichilingue Station

Quantitative variables assessed showed coefficients of variation being from 7% to 124%, the most discriminatory were weight of thousand seeds, grain length and ear diameter. On the contrary, the evaluated accessions showed little qualitative diversity, most of their data had frequencies above 50%, except for ear aspect and color of grain, which were the most variable. The polymorphic information content (PIC) of markers averaged 0,61; with allele frequencies inferred mostly 50%, and the SSR's most discriminating were Phi 011, Phi 014, Phi-015-033 and Phi -059, all with PIC values above 0,75.

## X. BIBLIOGRAFÍA

Abadie, Berretta. 2001. Caracterización y evaluación de recursos fitogenéticos en: "Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur". PROCISUR, Consultado 18 de septiembre de 2008. Disponible en:

[http://www.fagro.edu.uy/~fitotecnia/docs/Caracterizacion\\_y\\_Evaluacion\\_de\\_Recursos\\_Fitogeneticos.pdf](http://www.fagro.edu.uy/~fitotecnia/docs/Caracterizacion_y_Evaluacion_de_Recursos_Fitogeneticos.pdf)

Abadie T. 2001. Desarrollo de colecciones núcleo de recursos fitogenéticos, en: "Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur". PROCISUR. Consultado 21 de noviembre de 2008. Disponible en:

[http://www.fagro.edu.uy/~fitotecnia/docs/Colecciones\\_Nucleo.pdf](http://www.fagro.edu.uy/~fitotecnia/docs/Colecciones_Nucleo.pdf)

Amayo V., 2002. Aislamiento y caracterización de marcadores moleculares microsatélites a partir de la construcción de librerías genómicas enriquecidas de camote (*Ipomoea batatas* L.) Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. Consultado 14 de diciembre de 2008. Disponible en:

[http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/Basic/Ya%C3%B1ez\\_A\\_V/indice-Ya%C3%B1ez.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/Basic/Ya%C3%B1ez_A_V/indice-Ya%C3%B1ez.htm)

Araneda T. 2004. Apunte de marcadores moleculares. Departamento de Producción Animal. Facultad de Ciencias Agronómicas Universidad de Chile. Consultado 21 de noviembre de 2008. Disponible en:

[www.plataforma.uchile.cl/fg/semestre2/\\_2004/biotec/modulo/clase2/doc/marcadores.pdf](http://www.plataforma.uchile.cl/fg/semestre2/_2004/biotec/modulo/clase2/doc/marcadores.pdf)

Arnao E., Rodríguez N., Hinrinsen P., Jayaro Y., Ramis C., Pérez I. 2007. Evaluación de la diversidad genética de subespecies de arroz usando marcadores microsatelitales y AFLP. Fundación para la Investigación Agrícola DANAC, INIA. CENIAP. Venezuela y Chile. Consultado 15 de noviembre de 2008. Disponible en:

[http://sian.inia.gov.ve/repositorio/revistas\\_ci/Agronomia%20Tropical/at5701/arti/arnao\\_e.htm](http://sian.inia.gov.ve/repositorio/revistas_ci/Agronomia%20Tropical/at5701/arti/arnao_e.htm)

Baerga S. 2006. DNA Fingerprinting. Huella dactilar de ADN. Universidad de Puerto Rico. Humacao. Consultado 21 de noviembre del 2008. Disponible en:  
[www1.uprh.edu/micro/DNA%20FINGERPRINTING-SEPT%202006%5B1%5D.ppt](http://www1.uprh.edu/micro/DNA%20FINGERPRINTING-SEPT%202006%5B1%5D.ppt)

Barreto, Edmeades, Chapman, Crossa. 1993. El diseño alfa-látice en fitomejoramiento y agronomía: generación y análisis. Publicado en Síntesis de Resultados Experimentales del PRM 1992, Vol. 4, p. 273-283

Becerra V., Paredes M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agricultura Técnica. Chile. Consultado 21 de noviembre de 2008. Disponible en: <http://www.inia.cl/at/espanol/v60n3/html/art07.htm>

Biasutti C. A. 2007. Bancos de germoplasma en Argentina. Universidad Nacional de Córdoba. Consultado 14 de diciembre de 2008. Disponible en:  
<http://www.agro.uncor.edu/~mejogeve/Bancos.pdf>

Bonamico, Aiassa, Ibañez, Di Renzo, Díaz, Salerno. 2004. Caracterización y clasificación de híbridos simples de maíz con marcadores SSR1. INTA, Argentina. Consultado 21 de noviembre de 2008. Disponible en: [http://www.inta.gov.ar/ediciones/ria/33\\_2/09.pdf](http://www.inta.gov.ar/ediciones/ria/33_2/09.pdf)

Campos H., Seguel I. 2000. Biotecnología y recursos genéticos vegetales. Agro sur. Vol. 28, No. 1 Consultado 20 de noviembre de 2008. Disponible en:  
[http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S030488022000000100002&lng=es&nrm=](http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S030488022000000100002&lng=es&nrm=)

- Choukan, Hossainzadeh, Ghannadha, Warburton, Talei, Mohammadi. 2006. Use of SSR data to determine relationships and potential heterotic groupings within medium to late maturing Iranian maize inbred lines. *Field Crops Research* 95 (2-3): 212-222.
- CIMMYT. 1985. Manejo de ensayos e informe de datos para el programa de ensayos internacionales de maíz del CIMMYT.
- Encarta. 2008. Microsoft Corporation. Reacción en cadena de la polimerasa. Microsoft® Student [DVD].
- Engels, J., y Viser, L. 2007. Guía para el manejo eficaz de un banco de germoplasma. Manuales para bancos de germoplasma. N° 6. Bioversity international. Roma. Italia.
- FAO. 2002. Informes de organizaciones internacionales sobre sus políticas, programas y actividades en relación con la diversidad biológica agrícola. Comisión de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura. Roma, Italia. Consultado 21 de noviembre de 2008. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/ag/cgrfa/cgrfa10/r10i17s.pdf>
- FAO. 2004. El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2003-04. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. Consultado 6 de diciembre de 2008. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/y5160s/y5160s00.htm#TopOfPage>
- Franco, T. L. e Hidalgo, R. (eds.). 2003. Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico no. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p.

Froylan S., González R. 1990. Importancia de los Sistemas de Documentación en el Manejo de los Recursos Fitogenéticos. XXXVI Reunión Anual del PCCMCA. El Salvador. Publicado en Agronomía Mesoamericana. Vol. 2 (1991). Consultado 15 de septiembre del 2008. Disponible en: [http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v02n01\\_089.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v02n01_089.pdf)

Gallardo D., Moyano A., 2002. Estudio de la variabilidad genética de maíz *Zea mays* de altura en la sierra ecuatoriana. Informe técnico del proyecto de investigación. ESPE. IASA. Sangolquí. Ecuador.

George, Regalado, Warburton, Vasal, Hoisington. 2004. Genetic Diversity of Maize Lines in relation to downy mildew. *Euphytica* 135: 145-155.

Gonzales L. 2008. Evaluación de la diversidad genética en una colección de germoplasma de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de Ruanda. Pontificia universidad Javeriana. CIAT (centro internacional de agricultura tropical). Colombia. Consultado 14 de noviembre de 2008. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis156.pdf>

Hernández C., Esquivel E. 2004. Rendimiento de grano y características agronómicas en germoplasma de maíz de valles altos de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, septiembre, año/vol. 27, núm. Especial 1. Sociedad Mexicana de Fitotecnia, A.C., México. Pp. 27-31. Consultado 8 de septiembre de 2008. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=61009906&iCveNum=4043>

Hernández A, San Vicente F, Figueroa R. 2010. Evaluación y caracterización de líneas parentales de híbridos de maíz (*Zea mays* L.) en tres ambientes de Venezuela. *Interciencia*. Apr 2010, vol. 35 no 4. Venezuela.

IBPGR, CIMMYT. 1991. Descriptors for Maize. International Maize and Wheat Improvement Center, México City/International Board for Plant Genetic Resources. Consultado 29 de noviembre de 2008. Disponible en:

<http://www.bioversityinternational.org/fileadmin/bioversity/publications/pdfs/104.pdf>

InfoStat. 2008. InfoStat, versión 2008. Manual del Usuario. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, editorial Brujas. Argentina.

Jaramillo S., Baena M. 2000. Material de Apoyo a la Capacitación en Conservación Ex Situ de Recursos Fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Grupo Américas. Consultado 21 de noviembre de 2008. Disponible en:

[http://www.ipgri.cgiar.org/training/exsitu/web/m\\_ppal\\_informacion\\_documentacion.htm](http://www.ipgri.cgiar.org/training/exsitu/web/m_ppal_informacion_documentacion.htm)

Jiménez P., Collada C. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. Universidad Politécnica de Madrid. España. Consultado 6 de diciembre de 2008. Disponible en:

[http://www.inia.es/gcontrec/pub/jime2\\_1049103835935.pdf](http://www.inia.es/gcontrec/pub/jime2_1049103835935.pdf)

Junovich A. 2003. Semillas a través de los datos del III Censo Nacional Agropecuario, granos básicos de la Costa. Información del III Censo Nacional Agropecuario para el consejo consultivo de semillas. Proyecto SICA - III Censo Nacional Agropecuario. Consultado 18 de septiembre de 2008. Disponible en:

<http://www.sica.gov.ec/censo/contenido/Semillas%20de%20la%20COSTA%20web.pdf>

Legesse, Myburg, Pixley, Botha. 2006. Genetic diversity of African maize inbred lines revealed by SSR markers. *Hereditas* 144: 10\_17. Lund, Sweden.

Ligarreto, Ballén, Huertas. 1998. Evaluación de las características cuantitativas de 25 accesiones de maíz de la zona andina. CORPOICA. Colombia. Consultado 21 de noviembre de 2008. Disponible en:

[http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/Archivos/Revista/1\\_Evaluacindelascaractersitca.PDF](http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/Archivos/Revista/1_Evaluacindelascaractersitca.PDF)

Martínez W. 2007. Caracterización morfológica y molecular del Cacao Nacional Boliviano y de selecciones élites del Alto Beni, Bolivia. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

Mathias R., Sagredo D., Kalazich B. 2007. Uso de marcadores SSR para identificación de germoplasma de papa en el programa de mejoramiento de INIA de Chile. Agricultura técnica Vol. 67 - No 1. INIA.

Morales Y. 2002. Caracterización genotípica de plantas de maíz (*Zea mays L.*) utilizando secuencias microsatélites distribuidas uniformemente sobre el genoma. Departamento de Investigación. Universidad de Belgrano. Argentina. Consultado 21 de noviembre de 2008. Disponible en: [http://www.ub.edu.ar/investigaciones/tesinas/17\\_yokobori.pdf](http://www.ub.edu.ar/investigaciones/tesinas/17_yokobori.pdf)

Morales K. 2003. Evaluación y caracterización morfológica y molecular por microsatélites de genotipos de maíz (*Zea mays L.*) de altura, INIAP, EE-Santa Catalina. Ecuador. Tesis de grado previo a la obtención del título de Doctora en Biología.

Morillo E., Piedra G. 2002. Investigación de variedades/cultivares usando marcadores moleculares. Informe Técnico Anual. DENAREF. EE-Santa Catalina. INIAP. Ecuador. Consultado 20 de noviembre de 2008. Disponible en:

[http://mail.iniap-ecuador.gov.ec/isis/view\\_detail.php?mfn=5815&qtype=search&dbinfo=PADIPR&words=BIOLOGIA%20MOLECULAR](http://mail.iniap-ecuador.gov.ec/isis/view_detail.php?mfn=5815&qtype=search&dbinfo=PADIPR&words=BIOLOGIA%20MOLECULAR)

Ornella, Schlatter, Von Haniel-Niethammer, Manifiesto, Suárez, Eyherabide, Acevedo. 2001.

Empleo de marcadores moleculares de ADN para identificar genotipos de maíz (*Zea mays L.*). Congreso de Red de Biotecnología. Argentina. Consultado 21 de noviembre de 2008. Disponible en:

[http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc\\_2001/posters/03/03pdf/03-018.pdf](http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/03/03pdf/03-018.pdf)

Painting K. A., Perry M. C., Denning R. A., Ayad W. G. 1993. Guía para la documentación de recursos genéticos. Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos. Roma. Consultado 18 de septiembre de 2008. Disponible en:

<http://www.fao.org/dcrep/003/x7650S/x7650s00.HTM>

Pejic, Ajmone-Marsan, Morgante, Kozumplick, Castiglioni, Taramino, Motto, 1998.

Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theor Appl Genet.* 97: 1248-1255

Plucknett D., Williams J., Smith N., Anishetty M. 1992 Los bancos genéticos y la alimentación mundial; trad. por CIAT. San José, Costa Rica. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical. 260 p.

Puldon V. 2006. Documentación, conservación y multiplicación de germoplasma. Instituto de Investigaciones del Arroz. La Habana, Cuba. Consultado 8 de septiembre de 2008. Disponible en:

<http://www.agr.unne.edu.ar/.../Cuba.../11DOCUMENTACION,%20CONSERVACION%20Y%20GERMOPLASMA-Padron.pdf>

Reif, Warburton, Xia, Hoisington, Crossa, Taba, Muminovic, Bohn, Frisch, Melchinger. 2006. Grouping of accessions of Mexican races of maize revisited with SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 113 (2): 177-185.

Ríasco J., Victoria J, Ángel F. 2003. Diversidad genética en variedades de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) usando marcadores moleculares. CENICAÑA. Consultado 14 de noviembre de 2008. Disponible en:  
[http://www.dialnet.unirioja.es/servlet/fichero\\_articulo?codigo=2352019...0](http://www.dialnet.unirioja.es/servlet/fichero_articulo?codigo=2352019...0)

Roca W. Sin fecha. Biotecnología moderna, plantas transgénicas y agrobiodiversidad: Oportunidades y desafíos. REDPAPA. Consultado 21 de noviembre de 2008. Disponible en: <http://www.redepapa.org/wroca.pdf>

Sánchez V. 2002. Evaluación y caracterización morfológica y molecular de maíz *Zea mays* harinoso de altura. Informe del proyecto de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de ingeniero agropecuario. ESPE. IASA. Sangolquí. Ecuador.

Schlatter A., Eyhérbide G., Presello D., Alvarez M., Ornella L., Iglesias J. Sin fecha. Marcadores Moleculares en Maíz. INTA Pergamino, Buenos Aires. Consultado 21 de noviembre de 2008. Disponible en: [www.inta.gov.ar/ediciones/idia/cereales/maiz05.pdf](http://www.inta.gov.ar/ediciones/idia/cereales/maiz05.pdf)

Segovia V., Fuenmayor F. 2000. Un modelo operativo para la evaluación y caracterización de germoplasma de Maíz (*Zea mays L.*). V Jornadas Científicas del Maíz. Universidad Nacional Experimental de los Llanos Ezequiel Zamora. Venezuela. Consultado 8 de septiembre de 2008. Disponible en:  
<http://www.ceniap.gov.ve/pbd/Congresos/jornadas%20de%20maiz/5%20jornadas/11.htm>

Stuber, Hancock. 2008. Sustaining Plant Breeding–National Workshop. Crop Science Society of America, Vol. 48:25–29. WI. USA

Taba, S. (ed). 2005. Latin American Maize, Germplasm conservation regeneration, in situ conservation, core subsets and prebreeding; proceedings of a workshop held at CIMMYT. CIMMYT. Mexico.

Warburton, Ribaut, Franco, Crossa, Dubreuil, Betrán. 2005. Genetic characterization of 218 elite CIMMYT maize inbred lines using RFLP markers. Euphytica 142: 97–106

Xia X., Reif J., Melchinger A., Frisch M., Hoisington D., Beck D., Pixley K., Warburton M., 2005. Genetic diversity among CIMMYT maize inbred lines investigated with SSR Markers: II. Subtropical, tropical midaltitude, and highland maize inbred lines and their relationships with elite U.S. and european maize. Publicado en Crop Science. 45:2573–2582. USA.

Yáñez C., Zambrano J., Caicedo M., Sanchez V., Heredia J. 2003. Catalogo de recursos genéticos de maíces de altura ecuatorianos. Programa de maíz. Estación experimental Santa Catalina. INIAP. Quito. Ecuador.

Yunbi Xu, Crouch H. 2008. Marker-Assisted Selection in Plant Breeding: From Publications to Practice. Crop Science Society of America Vol. 48: 391–407. WI. USA.