



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR: SILVA CISNEROS MARÍA CRISTINA

**TEMA: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS RAZAS DE CANGUIL,
TUSILLA Y MEZCLAS DE MAÍZ DEL BANCO DE TRABAJO DEL
PROGRAMA DE MAÍZ DEL INIAP**

DIRECTOR: PHD. PROAÑO KARINA

CODIRECTOR: ING. TAPE MARCO

SANGOLQUÍ, ENERO 2014

CERTIFICACIÓN

Dra. Karina Proaño

Ing. Marco Taipe

Certifican:

Que el trabajo titulado CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS RAZAS DE CANGUIL, TUSILLA Y MEZCLAS DE MAÍZ DEL BANCO DE TRABAJO DEL PROGRAMA DE MAÍZ DEL INIAP, realizado por MARÍA CRISTINA SILVA CISNEROS, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE.

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 MARÍA CRISTINA SILVA CISNEROS que lo entregue a ING. MARÍA AUGUSTA CHÁVEZ, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, Enero 2014.

DIRECTOR
Dra. Karina Proaño

CODIRECTOR
Ing. Marco Taipe

CERTIFICACIÓN

Los suscritos certifican:

Que el trabajo titulado “Caracterización molecular de las razas canguil, tusilla y mezclas de maíz del Banco de Trabajo del Programa de Maíz del INIAP”, realizado por la egresada María Cristina Silva Cisneros, 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 este estudio es parte de las investigaciones realizadas por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias – INIAP y financiado por el proyecto Senescyt PIC-12-INIAP-008 Convenio: 20120322 “Generación de conocimientos y tecnologías para el cultivo de maíz suave y su contribución a la seguridad y soberanía alimentaria en la sierra ecuatoriana”, se deja en libertad de la autora y del INIAP, para 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). Se autoriza a María Cristina Silva que lo entregue a la MSc. María Augusta Chávez, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

María Augusta Chávez MSc.
COORDINADOR DE CARRERA

Msc.-Ing. Carlos Yáñez
DIRECTOR (INIAP)

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

María Cristina Silva Cisneros

Declaro que:

El proyecto de grado **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS RAZAS CANGUIL, TUSILLA Y MEZCLAS DE MAÍZ DEL BANCO DE TRABAJO DEL PROGRAMA DE MAÍZ DEL INIAP**, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, Enero del 2014.

MARÍA CRISTINA SILVA CISNEROS

AUTORIZACIÓN

Yo, María Cristina Silva Cisneros

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS RAZAS CANGUIL, TUSILLA Y MEZCLAS DE MAÍZ DEL BANCO DE TRABAJO DEL PROGRAMA DE MAÍZ DEL INIAP**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Enero del 2014.

MARÍA CRISTINA SILVA CISNEROS

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a DIOS, por darme la vida a través de mis queridos padres Elvia y Marco quienes con mucho cariño, amor y ejemplo han hecho de mí una persona de bien y con valores para poder desenvolverme en la vida.

A mis hermanos Daniel y Santiago por su paciencia, cariño y constancia en los momentos difíciles de mi vida. Por ser parte cada día de mis alegrías y compartir juntos nuestros logros.

A mi familia y amigos gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.

A todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

Criss

AGRADECIMIENTO

En primer lugar siempre le agradeceré a mi Dios, por darme la oportunidad de realizarme como profesional y tengo el firme propósito de que el siempre estará conmigo en todo lugar y todo momento.

A mis padres que con su apoyo, amor y confianza han logrado que llegue a cumplir mis metas. Gracias madrecita linda Elvia por ser el mayor ejemplo de constancia y trabajo en mi vida siempre serás la persona más importante en mi vida después de Dios, eres el mayor regalo que pudo haberme dado te amo con todo mi corazón. A mi querido Marquito por su comprensión y cariño, por ser siempre mi amigo, mi apoyo, gracias por confiar en mí y ser el impulso de todas mis luchas.

A mis hermanitos adorados Daniel y Santi que han sido mi ayuda, apoyo, compañía y mi mayor alegría. Por llenar siempre mi vida de momentos inolvidables y espero siempre estar unidos, esperando siempre en Dios el estar juntos en la eternidad.

Expreso mis sinceros agradecimientos al Instituto Nacional Autónomo de investigaciones Agropecuarias-INIAP, el apoyo brindado en este trabajo. En especial al Programa de Maíz por medio del Ing. Carlos Yáñez, jefe del Departamento, por permitirme la ejecución de esta tesis y sobre todo por su amistad, su guía y apoyo incondicional a todo momento.

Al Departamento Nacional de Biotecnología (DNB), por medio del Dr. Eduardo Morillo, jefe del Departamento por su guía y ayuda en el presente proyecto.

A mi querida Escuela Politécnica del Ejército, a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología.

A mi estimada Directora PhD Karina Proaño y mi codirector de tesis Ing. Marco Taípe gracias por su guía, su apoyo y todo el aporte para el desarrollo de esta investigación.

A mis amigos más que mis colaboradores Don Jorge, Alexis, Carlos, Anita, Juan por su apoyo incondicional a lo largo de la realización de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio Joha y Santi por apoyarme siempre y por su ayuda en el proyecto.

A Juan Pablo por ser una persona importante en mi vida, le doy gracias a Dios por ponerlo en mi camino porque ha sido un gran apoyo siempre tanto en los buenos como malos momentos. Te agradezco de todo corazón y espero que Dios nos guíe juntos en el camino que nos queda por recorrer.

Quiero agradecer a mis amigas, mis compañeras de locuras, gracias por apoyarme en todo momento Abita y Silvisu, siempre serán personas importantes en mi vida gracias por su valiosa amistad. A mis amigos Paul, Cristy, Santi Q, Santi T y mis compañeros de carrera gracias por ser parte de mi vida.

A todas las personas que pusieron su granito de arena o de alegría en el
trascuro de mi carrera. Gracias les llevaré siempre en mi corazón.

Criss

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

INIAP:	Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
TE:	Tris-EDTA
TRIS:	Tris-Borate-EDTA
CIA:	Cloroformo-alcohol isoamílico
SSRs:	Secuencias simples repetidas, del inglés <i>Simple Sequence Repeat microsatellites</i>
PCR:	Reacción en cadena polimerasa
PIC:	Contenido de información polimórfica
UPGMA:	Agrupamiento de pares no ponderados con medias aritméticas, de inglés <i>Unweighted Paired Grouping Method with Arithmetic Averages</i>
PCO:	Análisis de coordenadas principales
AMOVA:	Análisis molecular de varianza
Bootstrap:	Estima del error estándar de muestreo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	1
1.1.	Formulación del problema	1
1.2.	Justificación	2
1.3.	Objetivos.....	4
1.3.1.	Objetivo general.....	4
1.3.2.	Objetivos específicos	4
1.4.	Marco teórico	5
1.4.1.	Generalidades del maíz.....	5
1.4.1.1.	Clasificación taxonómica y descripción botánica	6
1.4.2.	Diversidad del maíz	7
1.4.2.1.	Diversidad genética del maíz.....	8
1.4.2.2.	Erosión genética y conservación	10
1.4.3.	Caracterización molecular	11
1.4.3.1.	Herramientas moleculares	12
1.4.3.2.	Análisis e interpretación de bandas	16
1.5.	Hipótesis de investigación	20
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....		21
2.1.	Participantes	21
2.2.	Zona de Estudio.....	21
2.3.	Periodo de tiempo de Investigación.....	22
2.4.	Diseño estadístico	22
2.5.	Procedimiento.....	23
2.5.1.	Material Vegetal.....	23
2.5.2.	Caracterización molecular	24
2.5.2.1.	Extracción de ADN.....	24
2.5.2.2.	Cuantificación de ADN en el espectrofotómetro para microplacas Epoch TM de BioTek	26
2.5.2.3.	Validación de ADN.....	27

2.5.2.4. Selección de primers con la técnica M13-Tailing SSR.....	29
2.5.2.5. Amplificación de reacciones dúplex y triplex de 9 primers con la técnica M13-tailing SSR para el analizador LI-COR 4300.....	32
2.5.2.6. Genotipaje de accesiones del Banco de Trabajo del Programa de Maíz en el software SAGA-GT Microsatélite.	36
2.6. Análisis de datos.....	37
2.6.1. Análisis de diversidad genética.....	37
2.6.2. Estructura genética	39
2.6.2.1. Análisis de Agrupamiento	40
2.6.2.2. Análisis Multivariado	41
2.6.3. Análisis estadístico de diversidad genética por razas y mezclas de maíz	41
2.6.3.1. Estadística F de Wright y estimadores análogos	41
2.6.3.2. Distancias genéticas	44
2.6.3.3. AMOVA.....	45
2.6.4. Estimaciones y medidas de confianza por re-muestreo.....	46
CAPÍTULO III: RESULTADOS.....	48
3.1. Germinación de semillas de maíz.....	48
3.2. Caracterización molecular.....	48
3.2.1. Extracción y cuantificación de ADN	48
3.2.2. Validación de ADN.....	48
3.2.3. Selección de primers con la técnica M13-Tailing SSR.....	49
3.2.4. Amplificación de las variedades de canguil, tusilla y mezcla de maíz con reacciones dúplex y triplex con los 9 primers mediante la técnica M13-tailing SSR para el analizador LI-COR 4300.....	52
3.2.5. Genotipaje de las accesiones del Banco de Trabajo del Programa de Maíz en el software SAGA-GT Microsatellite	54
3.4. Análisis estadístico	56
3.4.1. Análisis global de Diversidad Genética	56
3.4.2. Parámetros de diversidad genética.....	59
3.4.3. Estructura genética	60
3.4.3.1. Análisis de Agrupamiento	60

3.4.3.2. Análisis Multivariado	63
3.5. Análisis estadístico de diversidad genética por razas y mezclas de maíz	65
3.5.1. Canguil y Tusilla	66
3.5.1.1. AMOVA.....	66
3.5.1.2. Estadística F	68
3.5.2. Mezclas de maíz	70
3.5.2.2. Estadística F	71
3.5.2.3. Distancia genética Nei	72
3.6. Estimaciones y medidas de confianza por re-muestreo	73
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN.....	76
4.1. Caracterización molecular	76
4.2. Diversidad genética del maíz.....	78
4.3. Análisis de variabilidad genética por razas y mezclas de maíz	83
4.4. Estimaciones y medidas de confianza por re-muestreo	88
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES	90
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES.....	93
CAPÍTULO VII.....	94
BIBLIOGRAFÍA.....	94

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1: Microsatélites empleados para la validación del ADN.....	27
Tabla 2.2: Coctel de reacción para validación de muestras de ADN.....	28
Tabla 2.3: Programa de amplificación PCR para validación de muestras de ADN.....	29
Tabla 2.4: Coctel de reacción amplificación de ADN con técnica M13 tailing.....	30
Tabla 2.5: Programa de amplificación PCR para técnica M13 tailing.....	31
Tabla 2.6: Microsatélites empleados para la amplificación de dúplex y triplex con la técnica M13-tailing SSR para el analizador LI-COR 4300.	33
Tabla 2.7: Coctel de reacción para la amplificación de accesiones de maíz con la técnica M13 tailing en dúplex.....	34
Tabla 2.8: Coctel de reacción para la amplificación de accesiones maíz con la técnica M13 tailing en triplex.....	35
Tabla 3.1: Diversidad genética y contenido de información polimórfica (PIC) para las 14 muestras de maíz con 13 primers SSR.....	51
Tabla 3.2: Combinaciones de multiplex primer SSR para el genotipaje del Banco de Trabajo del Programa de Maíz.	52
Tabla 3.3: Alelos registrados con sus respectivas frecuencias para 86 materiales de maíz con 9 primers SSRs.	57
Tabla 3.4: Parámetros de diversidad genética de 258 muestras de Zea mays con 9 primers SSRs.....	60
Tabla 3.5: Valores eigen obtenidos a partir del análisis de coordenadas principales de 258 muestras de maíz analizado con 9 primers microsatélites.	64
Tabla 3.6: Análisis de varianza molecular para 34 accesiones de Zea mays con 9 primers SSRs.....	66
Tabla 3.7: Cálculo de parámetros F para las variedades de canguil y tusilla obtenidas del análisis de polimorfismo de 9 primers SSR.....	68
Tabla 3.8: Análisis de varianza molecular para 52 accesiones de Zea mays con 9 primers SSRs.....	70

Tabla 3.9: Cálculo de parámetros F para las mezclas de maíz obtenidas del análisis de polimorfismo de 9 primers SSR.	72
Tabla 3.10: Medida de variabilidad seleccionada obtenido a partir de la muestra original sin el uso de re-muestreo para 3 poblaciones con 9 primers SSR.	73
Tabla 3.11: Estimaciones puntuales por Bootstrap para medidas de diversidad genética por locus.	74
Tabla 3.12: Errores estándares por bootstrap para medidas de diversidad genética por locus.	74

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1.	Descripción del proceso PCR en los ciclos de reacción (Pérez de Castro, 2010).	14
Figura 1.2.	Ilustración de la detección de bandas en LI-COR 4300 medido con fluorescencia IRD-ye en un solo marcador infrarrojo (Biociencias, 2010).	16
Figura 1.3.	Patrón de bandas en gel de Poliacrilamida obtenido en el software SAGA-GT (Biociencias, 2010).	18
Figura 2.1.	Germinación de plántulas de maíz (canguil, tusilla y mezclas de maíz de 15 días de estadio) para el presente estudio. Se observa en A) siembra de semillas en invernadero y en B) germinación de las semillas de maíz. ..	24
Figura 2.2.	Extracción de ADN con primordios foliares de maíz de 15 días de estadio utilizando el protocolo Ferreira y Grattapaglia (1998), A) se observa la maceración de los primordios foliares con el buffer de extracción, B) emulsión del sobrenadante obtenido con CIA, C) adición de etanol al 100% en el sobrenadante D) precipitación del pellet en etanol.	26
Figura 3.1.	Amplificación de las muestras de ADN de hojas de maíz y 2 μ L de marcador 100bp, corridas en gel de agarosa al 2% y teñidas con Bromuro de etidio.	49
Figura 3.2.	Genotipaje de las 7 muestras de canguil y 7 muestras de tusilla con 13 primers de maíz. A) Genotipado con primers phi: 083, 033, 015, 059, 034 en el rango de amplificación de 800 nm. B) Genotipado con primers phi: 072, 031, 011, 014, 002, 053 en el rango de amplificación de 700 nm.	50
Figura 3.3.	Corrida electroforética de muestras de maíz en el LICOR 4300 con las combinaciones dúplex y triplex. A) combinaciones de primer phi072 y phi031, B) combinaciones de primer phi083 y phi033, C) combinaciones de primer phi015 y phi059, D) combinaciones de primer phi034, phi050 y phi053.	53
Figura 3.4.	Lectura del imagen del gel de poliacrilamida observado en el asistente de lectura SAGA-GT Microsatelite versión 3.3. con la combinación triplex con las muestras de la 1-86.	54

Figura 3.5.	Imágenes de geles obtenidos SAGA-GT Microsatelite versión 3.3 con los dúplex A, B, D y el triplex C que indican algunos alelos correspondientes a la amplificación.	55
Figura 3.6.	Número de alelos de 9 microsatélites utilizados en el genotipaje, para conocer la diversidad genética de maíz.....	56
Figura 3.7.	Dendrograma UPGMA basado en la distancia Shared Allele Distance, DAS que indica las accesiones de Zea mays.....	62
Figura 3.8.	Análisis de coordenadas principales (PCO) de 258 muestras de maíz analizados con 9 primers SSRs, con dos coordenadas.....	63
Figura 3.9.	Análisis de coordenadas principales (PCO) de 258 muestras de maíz analizados con 9 primers SSRs, visto en tres coordenadas.....	65
Figura 3.10.	Porcentajes obtenidos en el AMOVA de las razas canguil y tusilla de 100 muestras con 9 primers SSRs.....	67
Figura 3.11.	Porcentajes obtenidos en el AMOVA de las mezclas de maíz de 123 muestras con 9 primers SSRs.....	71

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A.	Colectas de maíz del Banco de Trabajo del Programa de Maíz del Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).	100
ANEXO B.	Tampón de extracción de material vegetal a los 15 días de estadio para el protocolo Ferreira y Gratapaglia (1998).	103
ANEXO C.	Combinaciones multiplex de primer SSR en 700 y 800 nm para el genotipaje de la colección núcleo de maíz (Garrido, 2010).	104
ANEXO D.	Resultados de la cuantificación en el espectrofotómetro EPOCH	105
ANEXO E.	Distancia genética de Nei de las razas canguil y tusilla (detalladas en el ANEXO A).	112
ANEXO F.	Distancia genética de Nei de maíces mezcla (detallado en el ANEXO A).	114
ANEXO G.	Datos del genotipaje con 9 microsatélites SSR de los 258 materiales de maíz.	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO H.	Datos de alelos reportados y rango de amplificación reportados por Nguyen <i>et al.</i> , (2012) y Morales (2003).	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO I.	Imágenes genotipadas obtenidas del software SAGA-GT de los dúplex y tripex formados con primers individuales en el canal 700 u 800 de las 258 muestras de maíz y 2 controles positivos.	¡Error! Marcador no definido.

RESUMEN

El maíz (*Zea mays* L.) debido a sus diversidad genética y a sus múltiples utilidades es un producto con alto interés de investigación en el país. Por esta razón, en la presente investigación se realizó el análisis de la variabilidad genética en este cereal. Se caracterizó molecularmente 86 accesiones pertenecientes al Banco de Trabajo del Programa de Maíz del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, determinándose la diversidad y estructura genética. Las muestras fueron genotipadas en el analizador de ADN LI-COR 4300. Los análisis de diversidad genética revelaron un total de 72 alelos de los 9 locus en análisis, con un promedio de 8 alelos/locus. El locus phi053 fue el más polimórfico. El PIC reportado fue de 0,58, la heterocigosidad esperada de 0,63 y la heterocigosidad observada de 0,46, siendo indicadores de la alta diversidad genética. El análisis de similitud UPGMA y el análisis de coordenadas principales PCO determinaron la falta de estructura genética en las muestras estudiadas. El análisis por razas canguil y tusilla reveló una diferencia genética de 7%, mientras que en comparación con los materiales mezclas de maíz presentan una diferencia genética del 4%. Con el análisis realizado se observó que la colección del Banco de Trabajo del Programa de Maíz posee diversidad genética, la mayor parte ocurre dentro de las poblaciones más que entre las razas. Por lo tanto es importante conservar la diversidad genética de las razas nativas de maíz por su valor económica, social y contribución en la alimentación humana.

Palabras clave: maíz, microsatélites, variabilidad, locus, molecular.

ABSTRACT

The maize is most important because of its valuable characteristics such their genetic diversity and their multiple uses is a product with high interest in research for the agriculture sector. A study of genetic variability in this seed was done in this research. It was carried out a molecular characterization of 86 samples of corn from the working collection of Maize Program (INIAP) which determined the genetic diversity and structure. Nine microsatellites was used using by the M13-Tailing technique. The samples were genotyped using the DNA analyzer LI-COR 4300. Genetic diversity analysis revealed a total 72 alleles in the 9 locus, showing an average of 8 alleles/locus. The locus phi053 was the most polymorphic. The PIC obtained was 0.58, the expected heterozygosity was 0.63 and the observed heterozygosity was 0.46, being indicators of high genetic diversity. The UPGMA similarity analysis and the principal coordinate analysis (PCO) identified the lack of genetic structure in the samples studied. The Analysis by races canguil and tusilla revealed a genetic difference of 7%, while compared to materials blends of maize have a genetic difference of 4%. This analysis it was observed that the collection of Maize Program has genetic diversity, most occurs within populations than among races. It is important to preserve the genetic diversity of the native races of maize by its value economic, social and contribution in the human diet.

Key words: maize, microsatellites, genetic diversity, locus, molecular.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS RAZAS DE CANGUIL, TUSILLA Y MEZCLAS DE MAÍZ DEL BANCO DE TRABAJO DEL PROGRAMA DE MAÍZ DEL INIAP

1.1. Formulación del problema

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia en el Ecuador, tanto por ser uno de los componentes básicos en la dieta de la población como por la gran cantidad de terreno destinado a su producción (Yáñez, 2002). Según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, para el 2011 la superficie cosechada de maíz (duro y suave) fue de 577.784 ha (INEC, 2012).

El maíz, además de tener relevancia en la alimentación e industria también se constituye como una fuente importante de diversidad genética, es así que se han reconocido en el Ecuador 29 razas, de las cuales 17 están ubicadas en la sierra ecuatoriana, mientras que las 12 razas restantes se ubican mayormente en la región litoral y la amazonia (Timothy *et al.*, 1966).

Lamentablemente, en las últimas décadas se ha presentado una mayor incidencia de erosión genética, pues se ha observado una considerable pérdida de especies nativas en el país. En el caso de la pérdida de los maíces criollos se debe al incremento de cultivos con variedades comerciales de mayor rendimiento, la introducción de modelos de producción de agricultura moderna,

expansión de la frontera agrícola y la modificación en los sistemas de producción, factores que han deteriorado la producción local de alimentos y la soberanía alimentaria (Cárcamo, 2009).

Entre las variedades criollas se encuentra el canguil, conocido internacionalmente como reventón, y sus derivados. Los especímenes típicos se encuentran a 2260 msnm, variedades de color amarillo, blanco, rojo o morado; mazorcas cortas, delgadas y cilíndricas con granos puntiagudos, plantas pequeñas y delgadas con hojas angostas en la base y con presencia de pequeñas aurículas, espigas erizadas de espículas densamente agrupadas (Timothy *et al.*, 1966).

Otra variedad de maíz criollo es la tusilla, cuyas especies típicas se encuentran desde 90 a 1500 msnm.; las cuales poseen mazorcas medianas de características flexibles, delgadas y cilíndricas, y con granos redondos duros de color amarillo naranja. Estas plantas son fuertemente desarrolladas con hojas largas, delgadas y rígidas, mientras que sus tallos son delgados con nudos bien pronunciados (Timothy *et al.*, 1966).

1.2. Justificación

La erosión genética en la agricultura provoca la pérdida de los recursos vegetales, por lo cual es de gran importancia su conservación. Para lograr este objetivo se emplea la caracterización del germoplasma, pues permite conocer de

mejor manera las características de las especies vegetales y de este modo aprovechar la diversidad existente en el germoplasma.

El conocimiento genético de las razas de maíz es de gran interés ya que se puede conocer más claramente el proceso evolutivo y domesticación de las especies. La evaluación genotípica y fenotípica de materiales nativos podría acelerar los programas de fitomejoramiento convencional e incrementar su eficiencia identificando material potencial para ser aprovechados.

La caracterización molecular es una herramienta importante en la evaluación de los recursos genéticos, pues permite conocer los genotipos de las variedades seleccionadas. Esta técnica detecta las diferencias a nivel de las secuencias de ADN mediante marcadores moleculares específicos, los cuales evitan que el efecto del ambiente enmascare la variabilidad. Al emplear la caracterización molecular en las razas de maíz criollas, se obtiene un poder discriminatorio entre accesiones.

Los marcadores moleculares microsatélites (SSRs) facilitan la caracterización molecular, pues poseen regiones altamente variables lo cual es muy útil para medir el nivel de polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas, además los SSRs representan un nivel adicional de información genómica que se puede usar para estudios posteriores de mapeo genético, estudios de poblaciones y la identificación de variedades.

La finalidad de este proyecto es conocer las diferencias y similitudes entre las variedades criollas a nivel de secuencias de ADN, para la identificación, clasificación y aprovechamiento de la diversidad genética existente en los genomas de las plantas de maíz. En el caso de la raza canguil se podrá rescatar, conservar y usar el germoplasma; mientras que en el caso de la raza tusilla se establecerá la información genética para determinar la diversidad y la relación entre accesiones, las cuales serán utilizadas como información base en programas de fitomejoramiento.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Caracterizar molecularmente las razas de canguil, tusilla y mezclas de maíz del Banco de Trabajo del Programa de Maíz del INIAP.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar la variabilidad genética de las razas de canguil, tusilla y mezclas de maíz a través de 9 marcadores moleculares microsatélites.
- Analizar la diversidad genética existente del germoplasma en estudio, mediante herramientas bioinformáticas que determinen accesiones potenciales para futuros programas de fitomejoramiento.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Generalidades del maíz

El maíz es considerado como el cereal de consumo más cotizado y necesario tanto para el hombre como para animales. Su origen y domesticación fue en Mesoamérica, difundiéndose posteriormente hacia todo el continente; constituyendo un elemento importante en el desarrollo de la agricultura. A partir de la cultura Valdivia se extendió a lo largo de la costa del Pacífico y sus alrededores, formando una de las plantas cultivadas de mayor diversidad genética cuya riqueza aún se mantiene. En la actualidad se considera que existen en el continente americano entre 220 y 300 razas de maíz (Mera & Mapes, 2009).

Las variedades nativas en cultivares de maíz son consideradas de gran valor por los campesinos debido a los valores culturales que poseen. Además son importantes en la agricultura industrializada puesto que contienen una enorme diversidad genética (incluidos los rasgos necesarios para adaptarse a plagas y a cambios en las condiciones climáticas y del suelo); también son relevantes para las formas sustentables de agricultura que mantienen los niveles de rendimiento de las cosechas, al tiempo que reducen los insumos externos que suelen ocasionar la degradación ambiental (Altieri, 2012). El maíz, es muy utilizado en forma de materia prima para la elaboración de productos alimenticios, farmacéuticos he industriales (Morejón, 2010).

En el Ecuador el PIB de la agricultura representa el 17.5%, del cual el maíz representa el 3%, es el cultivo con cobertura nacional que cubre una superficie de siembra alrededor de 500 mil hectáreas. Siendo uno de los más importantes cultivos a nivel nacional, debido a sus múltiples utilidades (INEC, 2012).

. El maíz es uno de los alimentos más consumidos en el mundo, y la incorporación de técnicas de mejoramiento genético a nivel de ADN permite la obtención de nuevas variedades en periodos de tiempo más cortos. La biotecnología en la actualidad se la considera como una herramienta que permite el mejor desarrollo de la agricultura pues genera nuevas alternativas a problemas que se presentan (Zerené, 2010).

1.4.1.1. Clasificación taxonómica y descripción botánica

El maíz (*Zea mays L*) es uno de los granos más antiguos pertenecientes al reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Liliopsida, subclase Commelinidae, orden Cyperales, familia Poaceae, género *Zea*, especie *Zea mays L* (Mostacero, Mejía, & Gamarra, 2002). Las formas salvajes del género *Zea* se conocen comúnmente como teosinte y las formas salvajes parientes de *Zea mays* del género *Tripsacum* se conocen como arrocillo o maicillo (Paliwal *et al.*, 2011).

El maíz es una planta de producción anual que presenta variedades que van desde 40 a 60 cm de altura, hasta gigantes de 200 a 300 cm, comúnmente

poseen tallo leñoso y cilíndrico, en promedio el número de nudos es de 16. Las hojas presentan una vaina en forma cilíndrica alrededor del entrenudo, con los extremos desnudos, son alargadas, alternadas y se encuentran enrolladas en el tallo. El color usual es verde pero presenta en algunas ocasiones rayas de color verde púrpura, el número de hojas varía entre 8 y 25. El sistema radicular está representado por un grupo de 1 a 4 raíces seminales en promedio, estas proporcionan los nutrientes necesarios a la planta y pueden alcanzar hasta dos metros de profundidad, también presentan raíces de sostén o soporte que se originan en los nudos, cerca de la superficie del suelo, promoviendo una mejor estabilidad y reduciendo los problemas de acame (Person, 1990).

El maíz es una planta monoica, es decir que posee ambos sexos, la inflorescencia estaminada se encuentra ubicada en la parte superior de la planta y posee una panícula o panoja, mientras que la inflorescencia pistilada o espiga se encuentra distribuida a lo largo del tallo en forma lateral. La espiga contiene a la mazorca que al ser polinizada puede tener ocho o más filas de granos. Por lo general un tallo puede tener entre 1-3 mazorcas (Acquaah, 2007).

1.4.2. Diversidad del maíz

El maíz posee una amplia variabilidad en color, textura, composición y apariencia del grano. Los tipos de maíz más importantes son: duro, dentado, reventón, harinoso, semi-harinoso y ceroso. El maíz duro tiene grano redondo, duro y suave al tacto. El endospermo está constituido de almidón duro córneo

con una pequeña parte de almidón blando en el centro del grano. El maíz reventón tiene endospermo duro que ocupa la mayor parte del grano y una pequeña cantidad de almidón blando en la parte basal del mismo. Los granos son pequeños, con pericarpio grueso y varían en su forma de redondos a oblongos. El maíz dentado tiene un endospermo con mayor cantidad de almidón. Muchos de los maíces dentados cultivados tienen pericarpio blanco, o amarillo (Paliwal *et al.*, 2001). El maíz harinoso posee el endospermo de un almidón muy blando y es el maíz predominante en las zonas altas de la región Andina (Grobman *et al.*, 1961). El maíz semi-harinoso o morocho ha sido desarrollado cruzando maíces de tipo harinoso y duro de zonas altas. Los granos tienen almidón blando en el centro con una capa periférica de almidón duro que los rodea. El maíz ceroso tiene endospermo opaco y ceroso pues el almidón está compuesto exclusivamente por amilopectina (Dintzis *et al.*, 1995; Paliwal *et al.*, 2001).

1.4.2.1. Diversidad genética del maíz

La diversidad genética se define como la variedad de alelos y genotipos presentes en un grupo de estudio, estas diferencias podrían proporcionarle al individuo, especie o población la capacidad de adaptación a distintas condiciones, es decir si una especie tiene escasa diversidad genética es más vulnerable a la extinción (Cerdeña, 2011).

El principal objetivo en estudios de diversidad genética es analizar, determinar y medir la variación existente entre y dentro de poblaciones o

accesiones. Al realizar este tipo de estudios dentro de una misma población, se logra evaluar las diferencias genéticas entre individuos, para determinar su potencial como nueva fuente de alelos para fitomejoramiento. En el caso del maíz se puede comprender más claramente la estructura genética, además permite trazar rutas para entender la migración del maíz a través del tiempo, he identificar a través de los cambios de frecuencia alélica la selección natural como resultado de la adaptación a un ambiente ecológico nuevo; permitiendo así determinar la fenología de estas fuentes diferentes de diversidad para identificar los alelos nuevos que serían más favorable en parámetros agronómicos (Bedoya, 2012).

El nivel de diversidad genética de una especie vegetal depende de varios factores tales como su biología reproductiva, tipo de cruzamiento, dispersión de polen y semillas, si es perenne o anual, la distribución de la especie y tipo de reproducción. Existe una gran diversidad genética en las características del maíz, como son: la planta, la mazorca, la semilla, resistencia a enfermedades e insectos, y tolerancia a varias presiones del ambiente, por lo que existe un mayor interés en su estudio. Igualmente se la considera como una planta alógama, es decir que puede presentar polinización cruzada y fecundación entre individuos genéticamente diferentes, en consecuencia presenta un alto grado de heterocigosis, generando plantas con un mejor rendimiento de los parentales. De esta manera se puede aprovechar estos mecanismos de reproducción para fomentar los programas de mejoramiento genético y así obtener nuevas variedades con características agronómicas deseadas (Acquaah, 2007; Cerda, 2011).

1.4.2.2. Erosión genética y conservación

El maíz es uno de los cultivos tradicionales que se ha mantenido, desarrollado y mejorado durante varios siglos por agricultores y mejoradores, debido a la percepción de las necesidades agrícolas que se presentan. Los cultivos tradicionales reciben varios nombres tales como variedades primitivas, variedades de los agricultores o variedades locales. Estas variedades locales son fuentes de características importantes para la estabilidad económica local y la sostenibilidad del agricultor (De Wet & Harlan, 1975; Brush, 1986).

Actualmente los cultivos están experimentando cambios rápidos en las prácticas agrícolas, producto de lo cual existe una pérdida de la biodiversidad que es conocida como erosión genética y se puede definir como el proceso de pérdida de la variabilidad genética en las especies. Esta pérdida se debe principalmente a varios factores como: reemplazo de variedades tradicionales por variedades mejoradas, cambios en el uso del suelo, migración, reducción en la proporción de la población de fincas agrícolas, cambios en los hábitos alimenticios y cercanía a mercados agrícolas que tienden a homogenizar y no diversificar las especies (Cárcamo, 2009).

En consecuencia la conservación y uso sostenible de las variedades tradicionales es de vital importancia; puesto que directa o indirectamente contribuyen a la supervivencia y bienestar local de las personas. Además

favorece en el aumento del suministro de alimentos y la producción agrícola (FAO, 2013).

1.4.3. Caracterización molecular

La caracterización molecular se considera como un grupo de técnicas que permiten detectar diferencias a nivel de las secuencias de ADN; con el uso de esta técnica se evita que el efecto del ambiente enmascare la variabilidad, lo cual se conoce como neutralidad de los caracteres moleculares (Ferreira & Grattaplagia, 1998).

Abadie y Berretta (2001) mencionan que la caracterización molecular permite establecer mejores criterios para obtener especies mejoradas, pero cabe recalcar que este tipo de análisis debe complementarse con la caracterización morfológica, pues los dos tipos de información tienen historias evolutivas diferentes y pueden mostrar facetas diferentes de la diversidad en las especies.

Para realizar la caracterización molecular se utilizan marcadores moleculares, estos permiten determinar genotipos y establecer las similitudes o diferencias genéticas existentes entre individuos. El desarrollo de marcadores moleculares es importante en la determinación de la pureza varietal y producción de semillas, ya que estos parámetros influyen favorablemente en características esperadas por el agricultor como: el rendimiento, la uniformidad y la calidad en cada una de las variedades de interés (Pejic *et al.*, 1998; Bonamico *et al.*, 2004).

1.4.3.1. Herramientas moleculares

1.4.3.1.1. Marcadores moleculares

En los programas de mejoramiento genético se utiliza marcadores moleculares como una herramienta muy eficaz para la selección de plantas con características agronómicas deseables, tomando como base principal la información genética y no solo la fenotípica. Las ventajas que poseen los marcadores moleculares es que permiten identificar altos niveles de polimorfismos independientemente del estadio de desarrollo en que se encuentre la planta, igualmente los resultados obtenidos del individuo de estudio no se ven influenciados por las interacción con el ambiente, obteniendo así resultados más confiables (Acquaah, 2007).

Se considera un marcador molecular ideal si es altamente polimórfico, codominante, preciso, reproducible, y de bajo costo (Jones, 2007). El uso de marcadores genéticos tipo SSR (*Simple Sequence Repeat*), han demostrado ser una de las mejores alternativas para el desarrollo de las investigaciones, debido a que permiten la identificación y discriminación de genotipos por su alta reproducibilidad y especificidad, brindando mayores conocimientos mediante la comparación de resultados (Moctezuma & Günter, 2000).

En el caso del maíz para determinar la variabilidad genética se utiliza marcadores moleculares tipo SSR, pues poseen excelentes características

codominantes y multialélicas que cubren totalmente el genoma, debido a esto son de gran utilidad para la conservación y el manejo del germoplasma. La caracterización molecular se basa en la amplificación de *loci* específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cada *loci* puede amplificarse individualmente utilizando oligonucleótidos específicos que reconocen regiones de secuencia única (Espinosa, 2007).

La evaluación del germoplasma de maíz mediante marcadores moleculares se utiliza principalmente para seleccionar un apropiado rango de diversidad dentro de un programa de mejoramiento, de igual manera permite identificar nuevas mezclas heteróticas, también permite elegir testigos en el desarrollo de híbridos, además de acelerar los programas de retrocruza e identificar genes agrónomicamente útiles (CIMMYT/IBPGR, 1991).

1.4.3.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

PCR son las siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa. Esta técnica se basa en sintetizar varias veces un fragmento de ADN utilizando una polimerasa (proviene de la bacteria *Thermus aquaticus*) que puede trabajar a temperaturas muy elevadas (79°C a 85°C). Para una reacción de PCR se realiza un mix o coctel de reacción, en donde se mezclan todos los componentes: taq polimerasa, el ADN del organismo de interés, los oligonucleótidos, dinucleótidos (dNTPs), y reactivos que son necesarios para el

buen funcionamiento de la enzima, como son: $MgCl_2$, buffer, agua ultra pura (Espinosa, 2007).

Este proceso consta de tres fases, como se detalla en la Figura 1.1, la primera es la desnaturalización en la cual el ADN se calienta hasta una temperatura de 90 a 95 °C durante 30 segundos; esto provoca la separación de las dos cadenas. La segunda fase, llamada templado, la temperatura de la mezcla baja hasta 55 °C durante 20 segundos para que los primers se enlacen con el ADN dividido. La tercera fase es 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

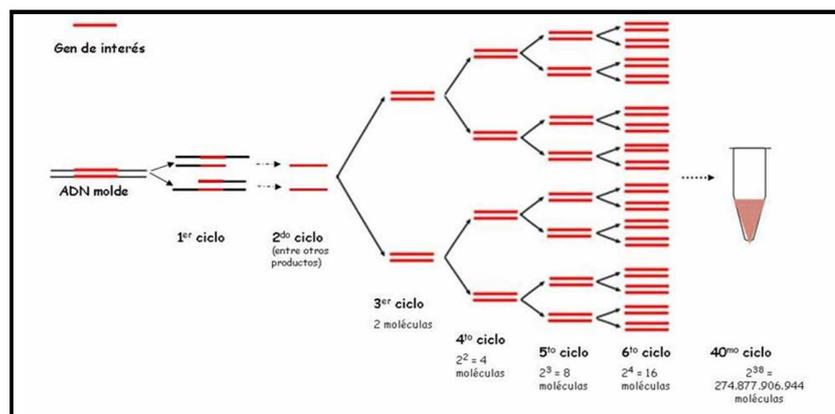


Figura 1.1. Descripción del proceso PCR en los ciclos de reacción (Pérez de Castro, 2010).

1.4.3.1.3. Secuenciador automático ADN Analyser LI-COR 4300

El LI-COR 4300 es un instrumento de tercera generación, semiautomático con tecnología sensible a la detección de fluorescencia infrarroja, la cual detecta las señales del marcador fluorescente de forma clara y con alto grado de sensibilidad. Este equipo utiliza electroforesis en geles de acrilamida (KBPlus Gel Matrix 6.5%, Cat. No. 827-05607) para sus diversas aplicaciones que son la secuenciación de ADN, análisis de AFLPs, de microsatélites, cADN, tilling y eco-tilling (LI-COR Biociencias, 2010).

En la detección de los microsatélites se utiliza el método M13-tailing en donde a cada uno de los primers SSR (secuencia forward) se le añadirá la secuencia de nucleótidos (5'-CAC GAC GTT GTA AAA CGA C-3') al extremo 5'. Durante la PCR, esta cola de nucleótidos se une al IRDye-labeled M13 Primer (secuencia complementaria marcada con fluorescencia infrarroja a 700 u 800 nm) que es añadido al coctel de reacción. De esta manera los productos de amplificación SSRs quedan marcados, al ser separados por electroforesis son detectados simultáneamente por los dos canales del genotipador, generándose dos imágenes de corrida en tiempo real, una en 700 nm y otra en 800 nm (Morillo & Miño, 2011).

Con la filtración óptica cada detector mide la fluorescencia IRD-ye en un solo marcador infrarrojo de los primers, evitando así que las bandas se superpongan, como se observa en la Figura 1.2. Finalmente la imagen se visualiza en el

software SAGA-GT, que es un asistente de lectura de las imágenes proporcionadas por el LI-COR 4300s. La matriz de datos obtenidos de SAGA es importada a EXCEL para continuar con el análisis. Las ventajas del proceso es que es semiautomático, el tiempo de corrida de un gel es de una hora y media, además el asistente de lectura software SAGA-GT facilita el registro de la información, y minimiza el error de lectura significativa aportando gran confiabilidad a los resultados (LI-COR Biociencias, 2010).

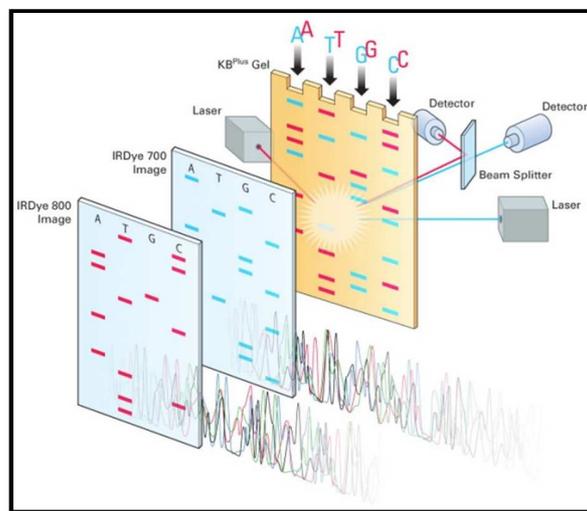


Figura 1.2. Ilustración de la detección de bandas en LI-COR 4300 medido con fluorescencia IRD-ye en un solo marcador infrarrojo (Biociencias, 2010).

1.4.3.2. Análisis e interpretación de bandas

En los diferentes patrones de bandas que presenta el genoma de los organismos puede observarse su diversidad genética, mediante el uso de software estadísticos se consigue definir de manera más clara la relación

existente entre los individuos de una determinada población (Weising, Nybom, & Meyer, 1995)

1.4.3.2.1. Consideraciones generales

Un patrón de bandas obtenido de muestras de ADN debe ser comparado unos con otros. La precisión y exactitud de las bandas consideradas son críticamente dependientes de varios parámetros metodológicos, incluyendo la calidad del ADN, condiciones electroforéticas y herramientas de detección. Estos parámetros se producen por: impurezas residuales, como por ejemplo proteínas, en el proceso de extracción del ADN; irregularidades en el campo eléctrico, por ejemplo variación en el voltaje que produce bandas inespecíficas; el movimiento resultante de las bandas, como por ejemplo traspasos en los pocillos del gel puede dar lugar a interpretaciones falsas al genotipar las muestras. Para reducir el índice de error en los parámetros ya mencionados se debe hacer duplicados de las muestras analizadas y el uso de una línea con marcadores de peso molecular (Espinosa, 2007).

Para minimizar el índice de error en la lectura de bandas es necesario tomar en cuenta las siguientes consideraciones (Moctezuma & Günter, 2000):

- El análisis a las bandas debe ser de fáciles interpretación.
- Las bandas que no presentan una definición con respecto a los marcadores moleculares, deben excluirse del análisis.

- Los fragmentos que co-migran con diferente intensidad no deben considerarse como idénticos, si la intensidad de una de las bandas representa más del doble con respecto a la banda delgada

1.4.3.2.2. Evaluación de bandas

Los patrones de bandas que se obtiene en el LI-COR 3000s son visualizadas en el software SAGA-GT, que es un asistente de lectura de imágenes, esta herramienta crea un proyecto en el cual cada alelo tiene el peso molecular de acuerdo al patrón de comparación (marcador molecular de 800 o 700 nm). Las ventajas de usar este método es que realiza un análisis rápido y semi-automático del proceso para localizar un alelo en la imagen del gel (Biociencias, 2010). En la Figura 1.3 se visualiza un ejemplo de patrón de bandas en el gel de poliacrilamida obtenido en el software SAGA-GT.

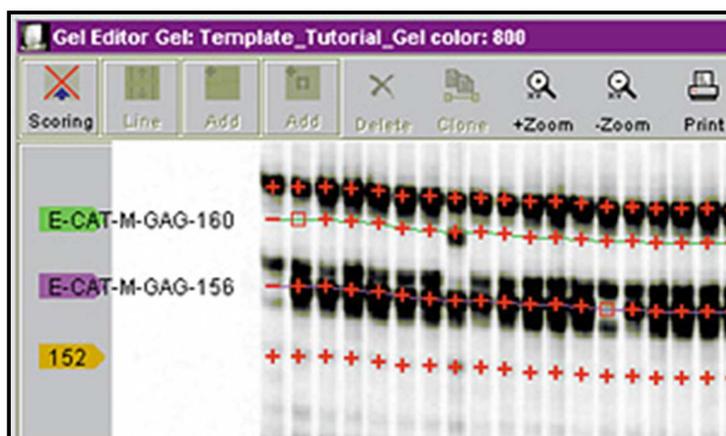


Figura 1.3: Patrón de bandas en gel de Poliacrilamida obtenido en el software SAGA-GT (Biociencias, 2010).

1.4.3.3. Estudios moleculares de maíz en Ecuador

En los avances recientes registrados por parte del INIAP en la caracterización molecular de maíz se destaca: “Evaluación y caracterización morfológica molecular por microsatélites de maíz (*Zea mays*) de altura”, el cual tuvo como objetivo general evaluar y caracterizar morfológica y molecularmente por medio de la técnica SSR a 24 genotipos de maíz de altura; se obtuvieron 74 alelos y en la visualización del dendograma se distinguieron 3 grupos, el grupo A fueron accesiones pertenecientes a *pooles*, el grupo B fueron materiales de origen Ecuatoriano y el grupo C constaban las familias de poblaciones avanzadas (Morales, 2003). En el proyecto “Caracterización molecular y análisis químico nutritivo de 27 accesiones de maíz chulpi (*Zea mays* L.) y 65 accesiones de maíz negro colectadas en la serranía del Ecuador”, se tuvo como objetivo evaluar la variabilidad genética y nutricional de maíz. Se obtuvieron de las 27 accesiones de maíz chulpi 278 alelos y se indicó 4 grupos, mientras que de las 65 accesiones de maíz negro se obtuvo 3 grupos y 2 accesiones divergentes (Jacho, 2009).

Los avances registrados por parte del Departamento Nacional de Biotecnología del INIAP sobre la “Caracterización molecular de la colección núcleo de maíz (*Zea mays*) de altura del banco de germoplasma del INIAP mediante marcadores moleculares microsatélites”, se considera como un estudio base para la presente investigación, ya que en su estudio se analizó diversos materiales de maíz y determinó la variabilidad genética mediante marcadores moleculares microsatélites. El objetivo principal fue determinar la variabilidad de

la colección núcleo a través de 13 marcadores microsatélites (SSR) de maíz en 136 accesiones, de lo cual se obtuvo un promedio de 7 alelos/locus lo que representa un alto nivel medio de riqueza alélica. El contenido de información polimórfica fue de 0.6143, indica que los primers son informativos para detectar la variabilidad en el conjunto de genotipos. Además con los análisis de agrupamiento se observó 3 grupos, con una diferencia entre poblaciones del 7.4% y una heterocigocidad media de 48% dentro de cada grupo, lo que conlleva a concluir que la diversidad genética no se explica por lugar de origen ni por variedad, sino por la migración de las poblaciones especialmente en la provincias de Loja, Azuay y Cañar hacia varias provincias del centro norte y oriente amazónico, en consecuencia se evidencia el movimiento de los materiales vegetales (Garrido, 2010)

1.5. Hipótesis de investigación

Las variedades de canguil y tusilla no se diferencian del resto de materiales a nivel genético, utilizando nueve marcadores moleculares microsatélites.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

El trabajo de tesis fue ejecutado por Cristina Silva y la institución donde se realizó la investigación fue el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) a través del Programa de Maíz y el Departamento Nacional de Biotecnología, bajo la dirección del Ing. Carlos Yánez Jefe del Programa de Mejoramiento de Maíz y como colaborador el Dr. Eduardo Morillo, Jefe del Departamento Nacional de Biotecnología. Además el presente trabajo tubo la dirección de la PhD. Karina Proaño y codirección del Ing. Marco Taipe como docentes encargados.

2.2. Zona de Estudio

La caracterización molecular se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental “Santa Catalina” ubicada en la parroquia Cutuglagua del cantón Mejía, provincia de Pichincha.

Esta localidad se encuentra a 3058 metros sobre el nivel del mar, a 00°22′00″ de latitud sur y a 79°32′00″ de longitud occidental. La precipitación en promedio anual es de 1127.5 mm, y la temperatura promedio es de 12.04 °C. La Estación,

presenta una humedad relativa del 76% (Datos proporcionados por la Estación Meteorológica Izobamba, perteneciente al Instituto Nacional de Meteorología (INAMHI), 2012).

2.3. Periodo de tiempo de Investigación

La investigación se desarrolló en un periodo de 12 meses

2.4. Diseño estadístico

Para la caracterización de la variabilidad de las razas de maíz del Banco de Trabajo del Programa de Maíz se utilizó el Software SAGA-GT, que es un asistente de lectura de las imágenes proporcionadas por el LI-COR 3000s. La matriz de datos obtenidos de SAGA es importada a EXCEL.

Para el análisis estadístico de los datos generados se utilizaron los siguientes paquetes estadísticos: GenAlex6.5 (Peakall & Smouse, 2012), PowerMaker (Liu & Muse, 2005), NTSYS-pc (Rolph, 1994), Infogen (Balzarín & Di Rienzo, 2004). Los parámetros de diversidad determinados fueron:

- *Análisis de diversidad genética*: Número y tamaño de alelos, frecuencia alélica, número de genotipos, contenido de información polimórfica (PIC), heterocigosis observada (H_o) y esperada (H_e)
- *Estructura genética*: Análisis de agrupamiento, Análisis multivariado.

- *Diversidad genética por razas y mezclas de maíz*: Estadística F , distancia genética de Nei, AMOVA.
- *Estimaciones y medidas de confianza por re-muestreo*: bootstrap.

2.5. Procedimiento

2.5.1. Material Vegetal

El material vegetal que será empleado en el presente estudio corresponde a las colectas realizadas por el Programa de Maíz, las cuales se detallan en el Anexo A y pertenecen al Banco de Trabajo del Programa de Maíz.

Para la siembra de semillas de maíz en el invernadero, se utilizó 3 semillas por cada accesión, es decir se trabajó con 258 semillas, estas semillas se desinfectaron con Hipoclorito de Sodio al 5% y se lavaron 3 veces con agua destilada antes de sembrarlas. Al cabo de 15 días de siembra se obtuvieron los primordios foliares como se detalla en la Figura 2.1.

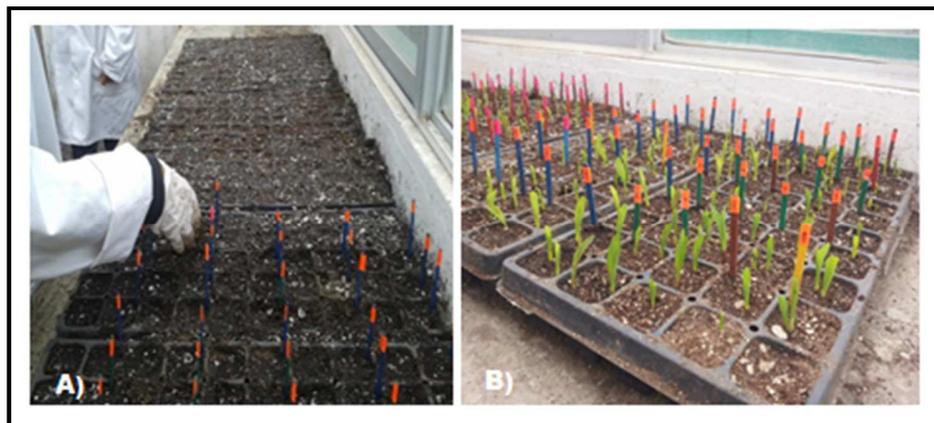


Figura 2.1: Germinación de plántulas de maíz (canguil, tusilla y mezclas de maíz de 15 días de estadio) para el presente estudio. Se observa en A) siembra de semillas en invernadero y en B) germinación de las semillas de maíz.

2.5.2. Caracterización molecular

2.5.2.1. Extracción de ADN

En la extracción de ADN se empleó muestras vegetales (primordios foliares) de 15 días. El protocolo de extracción que se utilizó en esta investigación fue de Ferreira y Grattapaglia (1998) (Morillo & Miño, 2011), el cual se detalla a continuación:

Se añadió 300 μ l del tampón de extracción (detallado en el ANEXO C) en un tubo eppendorf, el cual ya contenía la muestra fresca, con un pistilo desinfectado con alcohol se maceró la muestra y se colocó 700 μ l del tampón, esto se realizó en hielo picado para evitar la oxidación de las muestras. Se incubó las muestras a 65°C por 1 hora y se agitó cada 30 minutos. A continuación se centrifugó a

14000 revoluciones por 15 minutos. Se tomó el sobrenadante y se añadió 600 μ l de CIA (Cloroformo-alcohol isoamílico 24:1) se homogenizó bien la muestra en el vortex, se centrifugó a 1400 revoluciones por 5 minutos, este proceso se lo realizó dos veces. El sobrenadante obtenido fue trasladado a un tubo nuevo y se añadió 400 μ l de etanol frío al 100%, se mezcló suavemente y se dejó reposar en el congelador a -20°C por 2 horas. Después se centrifugó a 14000 revoluciones por 7 minutos, se retiró el etanol y se lavó dos veces el pellet con 1 ml de etanol al 75%. Se secó en la microestufa a 37°C por 30 minutos. Una vez evaporado el etanol se resuspendió el pellet en 100 μ l de TE 0.1X (Tris-HCL 1mM, EDTA 0.1 mM, pH 8) y se incubó a 65°C por 30 minutos, hasta que se diluyó el pellet completamente. Finalmente se conservó el ADN a 4°C . En la figura 2.2 se observa el proceso de extracción realizado con los primordios foliares de maíz.

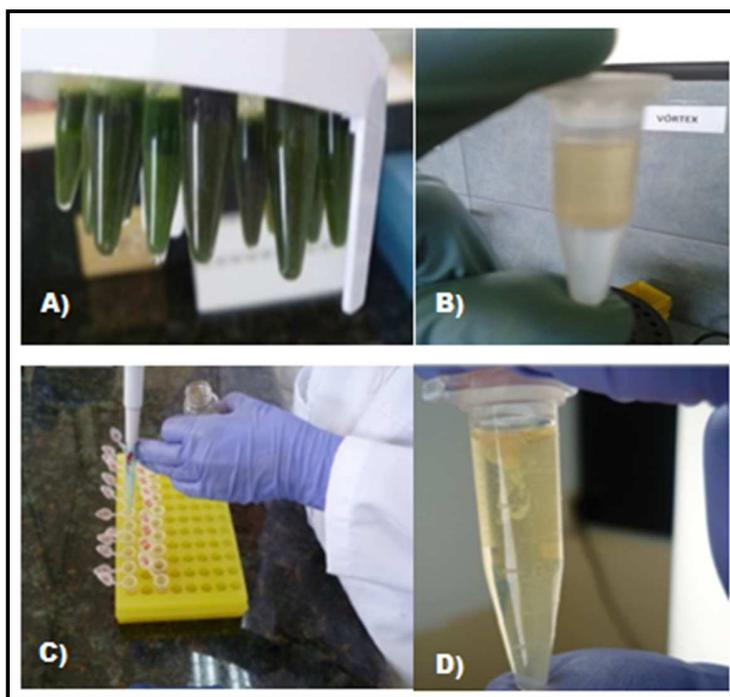


Figura 2.2: Extracción de ADN con primordios foliares de maíz de 15 días de estadio utilizando el protocolo Ferreira y Grattapaglia (1998), A) se observa la maceración de los primordios foliares con el buffer de extracción, B) emulsión del sobrenadante obtenido con CIA, C) adición de etanol al 100% en el sobrenadante D) precipitación del pellet en etanol.

2.5.2.2. Cuantificación de ADN en el espectrofotómetro para microplacas Epoch™ de BioTek

La cuantificación se realizó para determinar la concentración existente en la muestra, se midió mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro EPOCH™ de BioTek, el cual detectó la radiación emitida por las bases nitrogenadas presentes en el ADN en absorbancia de 260nm y 280nm (Rocha, 2002). En este equipo se colocó 2µl de ADN de a cuantificar en la placa Take3, la cual consta de 16 pocillos, en 2 de colocó el blanco (agua ultrapura) y en los

14 restantes las muestras, a continuación se realizó el análisis a través del software de datos Gen5. Los datos obtenidos se importaron a una tabla de Excel, en donde se detalla la concentración en unidades de ng/μl. A continuación se diluyó las muestras a una concentración de 5 ng/μl, en agua de tartrasina, para validar el ADN.

2.5.2.3. Validación de ADN

El objetivo de la validación es confirmar la calidad de ADN, por lo cual se realizó la amplificación con marcadores moleculares tipo SSR, con los primer phi116 y phi121 de maíz disponibles en el Departamento Nacional de Biotecnología (Tabla 2.1) (Senior, 1998).

Tabla 2.1: Microsatélites empleados para la validación del ADN

Locus	Secuencia*	Número de bases	Temperatura (°C)
<i>phi121</i>	F:AGGAAAATGGAGCCGGTGAACCA	23	56
	R:TTGGTCTGGACCAAGCACATACAC	23	
<i>phi116</i>	F:GCATACGGCCATGGATGGGA	20	56
	R:TCCCTGCCGGGACTCCTG	18	

*secuencias obtenidas en base de datos MaizGDB (Senior, 1998).

Los ensayos se realizaron con el coctel de reacción PCR detallado en la Tabla 2.2 (Morillo & Miño, 2011).

Tabla 2.2: Coctel de reacción para validación de muestras de ADN.

Componentes	1rx (uL)
Agua ultra pura	2.18
Buffer 5X PCR	1.50
MgCl ₂ (mM)	0.60
dNTP's (mM)	0.38
Primer F (uM)	0.38
Primer R (uM)	0.38
Taq polimerasa	0.10
Muestra	2.00
Total	7.5

Para constatar que no existe contaminación en la reacción, se incluyó un control negativo, el cual contenía todos los componentes de PCR excepto el ADN, además se colocó un control positivo que era ADN de maíz previamente validado. El Buffer 5X está compuesto por: 50 mM Tris (pH 8.5); 10 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 500 mg/μl de BSA; 0.01% Xilene cyanole, 1.5% Ficol 400.

La reacción fue cubierta con una gota de aceite mineral para evitar la evaporación de los componentes. La amplificación se realizó en un termociclador PTC 100 con el programa detallado en la Tabla 2.3 (Morillo & Miño, 2011).

Tabla 2.3: Programa de amplificación PCR para validación de muestras de ADN.

	T (°C)	Tiempo	
1	94	5 min	
2	94	45 seg	30 ciclos
3	56	1 min	
4	72	2 min	
5	72	7 min	
6	10	5 min	
7	4	5 min	

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en tampón TAE 1X con el marcador de referencia de 100bp ADN LadderMaker Invitrogen Cat No. 10488-058, se tiñó el gel de agarosa con Bromuro de etidio por 30 minutos y finalmente se visualizó los productos del gel bajo un transiluminador UV.

2.5.2.4. Selección de primers con la técnica M13-Tailing SSR

Para la selección de primers se probaron 13 primers SSR de maíz disponibles en el Departamento Nacional de Biotecnología (ANEXO D), recomendados y probados en estudios de microsatélites realizados por (Garrido, 2010); esto se efectuó con 14 muestras de ADN de maíz, 7 fueron de la raza canguil y 7 fueron de la raza Tusilla tomadas al azar. Los primers utilizados fueron phi: 72, 31, 11, 14, 53, 83, 33, 15, 59, 34, 41, 50, 2, los cuales fueron marcados con fluorescencia mediante el método M13 Tailing (Ref. M13-Tailing Forward IRDye 829-05565),

este método se basa en incorporar la secuencia del primer M13 (5'-CAC GAC GTT GTA AAA CGA C-3') al extremo inicial 5' del primer forward microsatélite para que los productos de amplificación sean detectados por los lectores láser del secuenciador automático de ADN Analyser LICOR-4300. El coctel de reacción se describe en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4: Coctel de reacción amplificación de ADN con técnica M13 tailing.

Componentes Monoplex PCR	1rx (uL)
Agua ultra pura	0.32
5X Colorless GoTaq FlexiBuffer (Promega)	1.00
MgCl ₂ Promega (25mM)	0.50
dNTP's Invitrogen (5mM)	0.20
M13 700/800 LI-COR (1Um)	0.80
Primer F-M13 (1uM)	0.05
Primer R (10uM)	0.08
GoTaq ADN Polymerase Promega (5U*uL ⁻¹)	0.05
Muestra (5 ng*µl ⁻¹)	2.00
Total	5

La reacción fue cubierta con una gota de aceite mineral para evita la evaporación de las muestras y fue amplificada en un termociclador PTC 100 con el programa detallado en la Tabla 2.5 (Morillo & Miño, 2011).

Tabla 2.5: Programa de amplificación PCR para técnica M13 tailing.

	°T	Tiempo	
1	94	2 min	
2	95	4 min	
3	95	1 min	25 ciclos
4	56	2 min	
5	72	2 min	
6	72	10 min	
7	4	10 min	

Los productos amplificados se diluyeron en blue stop para darles peso y color, seguidamente se los denaturó a 95°C por 5 minutos y se los colocó en hielo para cargarlos en el gel; el gel que se utilizó es de poliacrilamida al 6.5%, el cual fue preparó mezclando 20ml de Gel Matrix KB Plus 6.5% (Cat. No. 827-05607, LI-COR), 15 µl de TEMED y 150 µl de Persulfato de Amonio (APS) 10%, una vez realizada la mezcla se colocó entre dos placas de vidrio previamente lavadas con el detergente Alconox y con isopropanol, se colocó el peine para dar lugar a una línea base y se dejó polimerizar por una hora, una vez polimerizado el gel se colocó el peine y se ubicó la placa de vidrio en el secuenciador LI-COR 4300.

Se colocó 0.8 µl de los productos con las jeringas Hamilton en cada pocillo del gel, pues permite optimizar el proceso. Se cargó los productos que tenían marcaje de 800 nm, después de 5 minutos se cargó los productos con marcaje de 700 nm. Finalmente se realizó la corrida durante una hora cuarenta y cinco minutos a 1500 voltios, el láser del equipo reconoció la longitud de onda en la

que están las muestras y presentó en forma de bandas en la pantalla del computador, para continuar con el genotipaje.

Se realizó el genotipaje de las muestras para analizar los datos en el software estadístico PowerMaker, ya que se deseó conocer el nivel polimórfico de los primers para escoger los que posean el PIC (Contenido de información polimórfica) más alto. Para esto se creó en el software SAGA-GT un programa llamado PRUEBAS PRIMERS, en el cual se ingresó las tallas del marcador de peso molecular IRDye 700 u 800 nm, que van desde 50 a 350 pb, rango de tamaño esperado, nombre de cada primer, marcaje, y número de las accesiones de maíz. Al obtener la matriz en Excel se importaron los datos a PowerMaker y de los resultados obtenidos se seleccionó las combinaciones dúplex y triplex para el análisis de la diversidad en 86 accesiones de maíz.

2.5.2.5. Amplificación de reacciones dúplex y triplex de 9 primers con la técnica M13-tailing SSR para el analizador LI-COR 4300

Una vez seleccionados los primers se realizó la amplificación con las 86 accesiones del Banco de Trabajo del Programa de Maíz, con 9 primers microsatélites phi: 83, 33, 15, 59, 34, 53, 50, 72, 31 (Tabla 2.6) y 2 réplicas de cada accesión.

Tabla 2.6: Microsatélites empleados para la amplificación de dúplex y triplex con la técnica M13-tailing SSR para el analizador LI-COR 4300.

Locus	Secuencia*	Número de bases	Temperatura (°C)	Repeat
<i>phi072</i>	F:ACCGTGCATGATTAATTTCTCCAGCCTT	28	56	AAAC
	R:GACAGCGCGCAAATGGATTGAACT	24		
<i>phi031</i>	F:GCAACAGGTTACATGAGCTGACGA	24	56	GTAC
	R:CCAGCGTGCTGTTCCAGTAGTT	22		
<i>phi083</i>	F:CAAACATCAGCCAGAGACAAGGAC	24	56	AGCT
	R:ATTCATCGACGCGTCACAGTCTACT	25		
<i>phi033</i>	F:ATCGAAATGCAGGCGATGGTTCTC	24	56	AAG
	R:ATCGAGATGTTCTACGCCCTGAAGT	25		
<i>phi015</i>	F:GCAACGTACCGTACCTTTCCGA	22	56	AAAC
	R:ACGCTGCATTCAATTACCGGGAAG	24		
<i>phi059</i>	F:AAGCTAATTAAGGCCGGTCATCCC	24	56	ACC
	R:TCCGTGTA CT CGGCGGACTC	20		
<i>phi034</i>	F:TAGCGACAGGATGGCCTCTTCT	22	56	CCT
	R:GGGGAGCACGCCTTCGTTCT	20		
<i>phi050</i>	F:TAACATGCCAGACACATACGGACAG	25	56	AAGC
	R:ATGGCTCTAGCGAAGCGTAGAG	22		
<i>phi053</i>	F:CTGCCTCTCAGATTCAGAGATTGAC	25	56	ATAC
	R:AACCCAACGTA CT CCGGCAG	20		

*secuencias obtenidas en base de datos MaizGDB (Senior, 1998).

Para el dúplex se realizó el coctel que se detalla en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7: Coctel de reacción para la amplificación de accesiones de maíz con la técnica M13 tailing en dúplex.

Componentes DUPLEX PCR				1rx (uL)
Agua ultra pura				0.19
5X	Colorless	GoTaq	FlexiBuffer	1.00
(Promega)				
MgCl ₂ Promega (25mM)				0.5
dNTP´s Invitrogen (5mM)				0.20
M13 700/800 LI-COR (1Um)				0.80
Primer F-M13 (1uM)				0.05
Primer R (10uM)				0.08
Primer F-M13 (1uM)				0.05
Primer R (10uM)				0.08
GoTaq	ADN	Polymerase	Promega	0.05
(5U* μ L ⁻¹)				
Muestra (5 ng* μ l ⁻¹)				2.00
Total				5

Para el triplex se realizó el coctel detallado en la Tabla 2.8.

Tabla 2.8: Coctel de reacción para la amplificación de accesiones maíz con la técnica M13 tailing en triplex.

Componentes DUPLEX PCR				1rx (uL)
Agua ultra pura				0.27
5X	Colorless	GoTaq	FlexiBuffer	1.40
(Promega)				
MgCl ₂ Promega (25mM)				0.70
dNTP´s Invitrogen (5mM)				0.28
M13 700/800 LI-COR (1Um)				1.12
Primer F-M13 (1uM)				0.07
Primer R (10uM)				0.11
Primer F-M13 (1uM)				0.07
Primer R (10uM)				0.11
Primer F-M13 (1uM)				0.07
Primer R (10uM)				0.11
GoTaq	ADN	Polymerase	Promega	0.07
(5U* μ L ⁻¹)				
Muestra (5 ng* μ L ⁻¹)				2.80
Total				7

Las combinaciones de dúplex y triplex consiste en amplificar dos o tres primers en una misma reacción PCR, tomando en cuenta que entre los fragmentos amplificados exista una diferencia de 30 pb, que posean la misma fluorescencia M13 y la misma temperatura de annealing. El coctel de cada reacción se cubrió con una gota de aceite mineral y se amplificó en el termociclador PTC 100, con el siguiente programa: la denaturación inicial consta de dos pasos, el primero es a 94 °C por 10 minutos y el segundo es a 95 °C por

4 minutos, esto seguido por 25 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 2 minutos de anillamiento a 56°C, 2 minutos de elongación a 72 °C; finalmente terminados los ciclos hay una elongación a 72°C durante 10 minutos y conservación de la muestra a 4°C.

Una vez culminada la PCR se colocó 5 µl blue stop en cada posillo, seguidamente se denaturó los productos a 95°C por 5 minutos y se los colocó en hielo. Para dar inicio a cada corrida se realizó una precorrida de 25 minutos, antes de cargar las muestras. Se procedió a cargar 0.8 µl del producto amplificado en el gel de acrilamida del secuenciador LICOR 4300, una vez cargadas las muestras se cargó el marcador de peso molecular IRDye 700 u 800 nm en los posillos pertenecientes a los marcadores. La corrida fue de una hora cuarenta y cinco minutos a 1500 voltios.

2.5.2.6. Genotipaje de accesiones del Banco de Trabajo del Programa de Maíz en el software SAGA-GT Microsatélite.

Se creó un programa llamado MAIZ en el que se ingresó la información correspondiente: peso del marcador molecular IRDye 700 u 800 nm, código de primers, combinaciones y peso molecular de los primers, nombre de las accesiones de maíz de acuerdo con el arreglo de las posiciones en el gel. Finalizado el tiempo de corrida se observó bandas, que mediante el SAGA-GT se determinó si las bandas correspondían a alelos homocigotos o heterocigotos,

al confirmar el genotipaje se genera un reporte que muestra los pesos de los alelos de cada locus en pares de bases y las frecuencias alélicas en porcentaje.

2.6. Análisis de datos

Los datos obtenidos en el SAGA-GT se importó al programa Microsoft Excel, en donde se obtuvo una matriz genotípica que muestra el tamaño de los alelos (pb) reportados por cada *loci*, esta matriz permite identificar a cada individuo con un genotipo. Si no existió amplificación se etiqueta con signos de interrogación, a continuación se efectuó una nueva amplificación de los GAP's, los locus microsatélites que no amplificaron se consideran como datos perdidos. Finalmente, se elaboró la matriz genotípica final, de acuerdo a las secuencias repetidas y alelos reportados tomados por Morales (2003) y Nguyen *et al.*, (2012).

2.6.1. Análisis de diversidad genética

Para el estudio de diversidad genética se utilizó el software PoweMaker versión 3.0 (Liu & Muse, 2005), para lo cual la matriz realizada en Excel se guardó como formato "*.txt" y seguidamente se importó al programa para el cálculo de los siguientes parámetros:

- **Frecuencia alélica:** Es la proporción que relaciona el número de veces en que un alelo se encuentra presente en relación con el número total de alelos de la población de estudio para cada locus. El cálculo de las frecuencias alélicas

de una población se hace teniendo en cuenta que los homocigotos tienen dos alelos idénticos y los heterocigotos dos alelos diferentes.

- **Genotipos:** Número de veces que aparece el genotipo en una población.
- **Tamaño de la muestra:** Número de individuos analizados.
- **Número de observaciones:** Número de genotipos observados para las accesiones en cada locus.
- **Número de alelos:** Cantidad de alelos en un locus.
- **Porcentaje de locis polimórficos:** Un locus será polimórfico si el alelo más común presenta una frecuencia menor al 0.9 en la población de estudio (Aranguren *et al.*, 2005).
- **Heterocigosis Observada (Ho):** se define como la frecuencia *loci* heterocigóticos por individuo. A mayor frecuencia de un alelo existe mayor heterocigosis (Aranguren *et al.*, 2005). Se calcula de la siguiente manera:

$$H_o = \frac{\text{Individuos heterocigotos}}{\text{Número total de materiales}}$$

- **Heterocigosis Esperada (He):** es la probabilidad que dos alelos tomados de la población al azar sean diferentes. Este parámetro es un buen estimador de la variabilidad porque se aplica en cualquier especie independientemente de su estructura reproductiva o genética, logrando realizar comparaciones entre ellas, se calcula de la siguiente manera:

$$\widehat{H}_e = 1 - \sum_{u=1}^k \widehat{P}_{1u}$$

- **Contenido de información polimórfica (PIC):** es la medida de diversidad estrechamente relacionada, es decir es la medida de informativa de un marcador genético, que depende del número de alelos para ese locus y de sus frecuencias relativas. El PIC es similar al valor de heterocigosidad y oscila entre 0 y 1 (Aranguren *et al.*, 2005). Se calcula de la siguiente manera:

$$\widehat{PIC}_1 = 1 - \sum_{u=1}^k \tilde{p}_{1u}^2 - \sum_{u=1}^{k-1} \sum_{v=u+1}^k 2\tilde{p}_{1u}^2 \tilde{p}_{1v}^2$$

2.6.2. Estructura genética

Una población es un grupo de individuos que viven en la misma área geográfica y comparten un conjunto de genes que potencialmente pueden cruzarse entre sí, los alelos compartidos por estos individuos constituyen el conjunto de genes de la población. La naturaleza dinámica de las poblaciones puede dar cambios en la estructura genética con el tiempo, lo que corresponde al patrón de distribución de variación genética entre individuos de una población y entre poblaciones (Young, Boyle, & Brow, 1996).

Las diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones constituyen la estructura genética. Si una especie posee alta estructura genética, existen grandes diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones; en contraste, en una especie con baja estructura genética, las poblaciones que la

constituyen son casi idénticas, con nulas o muy pocas diferencias en las frecuencias alélicas. Si las poblaciones de una especie son muy distintas genéticamente indica que los tamaños de las poblaciones han sido pequeños y ha existido poco flujo génico entre estas poblaciones por mucho tiempo (Eguiarte *et al.*, 2010).

El método para estimar la proporción de variación genética que se encuentran dentro y entre las poblaciones, es el estadístico F de Wright, que comparan cuantitativamente las diferentes especies. Estos estimadores en principio tienen la ventaja adicional de que nos pueden dar el estimado conjunto de la importancia de la deriva génica y el flujo genético (Eguiarte *et al.*, 2010).

2.6.2.1. Análisis de Agrupamiento

La matriz genotípica se convirtió en el software PowerMarker V3.0, en una matriz de distancia escogiendo la opción de alelos compartidos (Shared Allele Distance, DAS). El cálculo de la distancia genética entre dos poblaciones da una estimación relativa del tiempo que ha transcurrido desde que las poblaciones se han establecido. Bajas estimaciones de distancia pueden indicar una subestructura de la población, o indicar que las poblaciones están separadas desde periodos cortos de tiempo (Liu & Muse, 2005). Con esta matriz se elaboró el árbol UPGMA, el cual está basado en una matriz de distancias genéticas individuales.

2.6.2.2. Análisis Multivariado

Para conocer los patrones de ordenamiento en las relaciones genéticas entre los aislamientos se utiliza el análisis de coordenadas principales (PCO), tomando como base una matriz de similitud que utilizó el coeficiente Dice como medida de distancia. El objetivo de este método es representar gráficamente las distancias entre muestras, maximizando la correlación lineal entre distancias de una matriz en un espacio de dos o tres ejes. Al realizar este proceso se obtienen nuevas variables no correlacionadas, denominadas componentes principales, que son una combinación lineal de todas las variables originales y que están asociadas con un valor propio que indica la magnitud de la variabilidad (Silva, 2011). Para este estudio se utilizó el programa NTSYS-pc calculando para tres ejes de coordenadas.

2.6.3. Análisis de diversidad genética por razas y mezclas de maíz.

2.6.3.1. Estadística F de Wright y estimadores análogos

Para describir la estructura genética dentro y entre poblaciones se estimaron los estadísticos *F* de Wright (F_{is} , F_{it} , F_{st}). Es un método que relaciona el coeficiente de endogamia en una población subdividida (F_{it}) entre el componente debido a apareamientos no aleatorios dentro de poblaciones (F_{is}). Así la endogamia total tendría un componente generado por la cruce entre parientes dentro de una población (F_{is}) y otro por el balance entre deriva génica y flujo genético (F_{st}). Los

estadísticos F son la correlación entre genes homólogos tomados de un nivel de la subdivisión en relación con cualquier otro nivel superior. La correlación entre los genes de los individuos (i) y los de la población total (t) se representa por F_{it} , que corresponde a la endogamia total; la correlación entre los genes de los individuos y los de la subpoblación y los de la subpoblación (s) se representa por (F_{is}); la correlación entre los genes de la población y la población total se representa por F_{st} , que es igual a la probabilidad de autocigosis. Los estadísticos F se relacionan entre sí de la siguiente manera (Piñeiro, 2008).

$$(1 - F_{it}) = (1 - F_{st})(1 - F_{is})$$

$$F_{st} = \frac{F_{it} - F_{is}}{1 - F_{is}}$$

- **Coefficiente de consanguineidad F (Wright's, F_{it}):** Mide el grado de endogamia total en las poblaciones, estimando la reducción en la heterocigosidad individual promedio a nivel de toda la población (Hedrick, 1999).

$$F_{it} = \frac{1 - H_o}{H_t}$$

Donde:

Ht: Heterocigosidad promedio esperada en una población con apareamiento aleatorio.

Ho: Heterocigosidad individual promedio observada a nivel de subpoblaciones.

- **Coeficiente de consanguineidad intrapoblacional f (Wright's, F_{is}):**

Mide la reducción de la heterocigosidad individual promedio debido a apareamientos no aleatorios dentro de cada subpoblación (Hedrick, 1999).

$$F_{is} = \frac{1 - H_o}{H_s}$$

Donde:

Hs: Heterocigosidad promedio esperada para todos los locis.

Ho: Heterocigosidad observada a nivel de subpoblaciones

- **Coeficiente de coancestría θ (Wright's, F_{st}):** Es una medida de diferenciación genética entre poblaciones, además implica una reducción en la heterocigosidad de la subpoblación. Este coeficiente toma valores entre 0 y 1; 0 si todas la poblaciones son idénticas entre ellas en términos de variación genética, mientras que si el valor es igual a 1 indica que son completamente diferentes entre sí (Hedrick, 1999).

$$F_{st} = \frac{1 - H_s}{H_t}$$

Los estimadores análogos tienen la ventaja de proporcionar el número efectivo de migrantes por generación (Nm). El valor del flujo genético indica el número de organismos que llegan a una población y se incorporan a su

diversidad génica, es un número absoluto y no es necesario conocer el tamaño efectivo de los alelos. El flujo genético efectivo puede calcularse en el equilibrio de manera teórica como (Eguiarte *et al.*, 2010):

$$Nm \approx \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{st}-1} \right) \text{ para organismos diploides}$$

2.6.3.2. Distancias genéticas

La medida de distancia genética más usada es la distancia de Nei, este índice pretende estimar el número de mutaciones a nivel de nucleótidos, que se han acumulado en las secuencias de dos linajes a partir del tiempo que ha transcurrido desde su divergencia original. La presencia o ausencia de loci se debe a una base nucleotídica distinta. A partir de datos de frecuencias alélicas se calcula estadísticamente el número promedio de las diferencias en las bases nucleotídicas por locus. Dado que el número es una medida directa de las diferencias genéticas entre dos poblaciones, se lo considera como una medida de distancia genética (Piñeiro, 2008).

Nei (1987) indica que el promedio en el número neto de sustituciones nucleotídicas (D) esta dado por:

$$D = -\log_e I$$

Donde I es la identidad genética igual a:

$$\frac{J_{xy}}{(J_x J_y)^{1/2}}$$

Donde $J_x = \sum x_i^2$ (sumatoria de las frecuencias alélicas al cuadrado de la población 1), $J_y = \sum y_i^2$ (sumatoria de las frecuencias alélicas al cuadrado de la población 2) y J_{xy} es igual a la sumatoria del producto para cada alelo de las frecuencias alélicas en la población 1 multiplicada por las frecuencias alélicas de ese mismo alelo en la otra población. Si las frecuencias alélicas son las mismas, entonces $J_x = J_y$ y la $I=1$ (identidad máxima posible), mientras si no comparten ningún alelo la J_{xy} va a ser 0 y en consecuencia $I=0$ (identidad mínima posible). Por lo tanto D toma valores de 0 si son idénticas las poblaciones e infinito si son diferentes.

2.6.3.3. AMOVA

Debido a diferentes factores las poblaciones se dividen en subpoblaciones, las cuales tienen diferencias en la frecuencia alélica de la población original. El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) es un método estadístico no paramétrico de permutación de datos, que diferencia entre poblaciones mediante datos moleculares, considera a los datos de la población original como un vector de presencia ausencia para calcular la matriz de distancias, donde las distancias cuadradas para todas las combinaciones de pares de vectores se coloca en una matriz, la cual se divide en sub-matrices de acuerdo a las divisiones

correspondientes de las poblaciones (Sanchez, 2011) . Este análisis se realizó con el paquete estadístico GenAlex6.5.

2.6.4. Estimaciones y medidas de confianza por re-muestreo

En estudios de variabilidad genética, las propiedades distribucionales de las medidas calculadas pueden no ser fáciles de derivar analíticamente debido a complejas estructuras de muestreo o expresiones no lineales de los estadísticos usados. En estos casos los procedimientos bootstrap y jackknife permiten una estimación empírica de parámetros genéticos y de los errores estándares necesarios para construir un intervalo de confianza (Balzarín & Di Rienzo, 2004).

Bootstrap: este procedimiento es obtenido por un muestreo aleatorio con reposición desde la muestra original. Para este análisis se utilizó el software Infogen, el cual para el análisis considera una muestra original de tamaño n , que puede ser utilizada para obtener varias muestras bootstrap. Comúnmente las muestras bootstrap tienen el mismo tamaño (n) que la muestra original. Para el cálculo del error estándar (EE) por bootstrap para un estimador de variabilidad genética se realiza el siguiente procedimiento (Balzarín & Di Rienzo, 2004):

- Se obtiene una muestra bootstrap y calcula el estimador deseado $\hat{\theta}$
- Se repite el paso anterior k veces

- La estimación bootstrap del parámetro θ es la medida de los valores del estimador $\hat{\theta}$ obtenido a través de las k muestras bootstrap, $\theta^{-B} = \frac{1}{K} \sum_{i=1}^k \hat{\theta}_i$, y el

error estándar del estimador es $EE^B = \sqrt{\frac{1}{K-1} \sum_{i=1}^k (\hat{\theta}_i - \theta^{-B})^2}$

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1. Germinación de semillas de maíz

De los 86 materiales (ANEXO A), se obtuvo un 99% de germinación. En el caso de la accesión número 45 (Tusilla) solo germinó una plántula, por lo cual para este estudio se consideró solo una accesión sin replicas.

3.2. Caracterización molecular

3.2.1. Extracción y cuantificación de ADN

El protocolo utilizado de Ferreira y Grattapaglia (1998) fue óptimo para la extracción de ADN (tanto de muestra fresca como de muestra seca), pues las 258 muestras presentaron una concentración de ADN genómico promedio de 631,378 ng/μl. Las concentraciones obtenidas se muestran en el Anexo E.

3.3.2. Validación de ADN

La validación de ADN de las 258 muestras de maíz se realizó con los primers phi116 y phi121 disponibles en el Departamento Nacional de Biotecnología. La corrida electroforética se realizó en geles de agarosa al 2% como se detalla en la Figura 3.1, donde se presenta la validación de algunas muestras. En la figura

se observa que todas las bandas obtenidas tuvieron el rango de tamaño esperado (100-200 pb) comparadas con el marcador 100bp DNA Ladder.

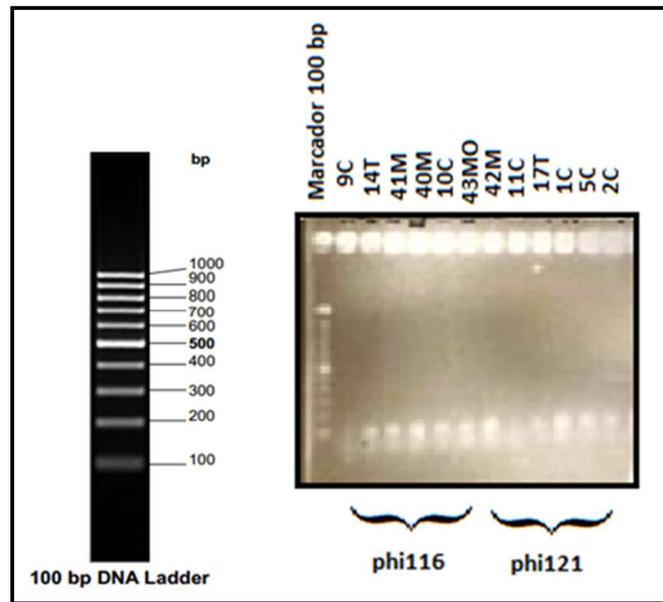


Figura 3.1. Amplificación de las muestras de ADN de hojas de maíz y 2 μ L de marcador 100bp, corridas en gel de agarosa al 2% y teñidas con Bromuro de etidio.

3.2.3. Selección de primers con la técnica M13-Tailing SSR

Los 13 primer microsatélites con 6 combinaciones multiplex reportados por Garrido (2010) (Anexo D), fueron probados con 7 muestras de la raza canguil, 7 muestras de la raza tusilla y un control positivo de maíz, con la finalidad de utilizar los que posean el contenido de información polimórfica más alta. Se realizó la amplificación de las muestras y seguidamente la corrida de las mismas en geles de poliacrilamida. A continuación, se visualizó las bandas obtenidas con un buen rendimiento y se genotipo las muestras como se observa en la Figura 3.2.

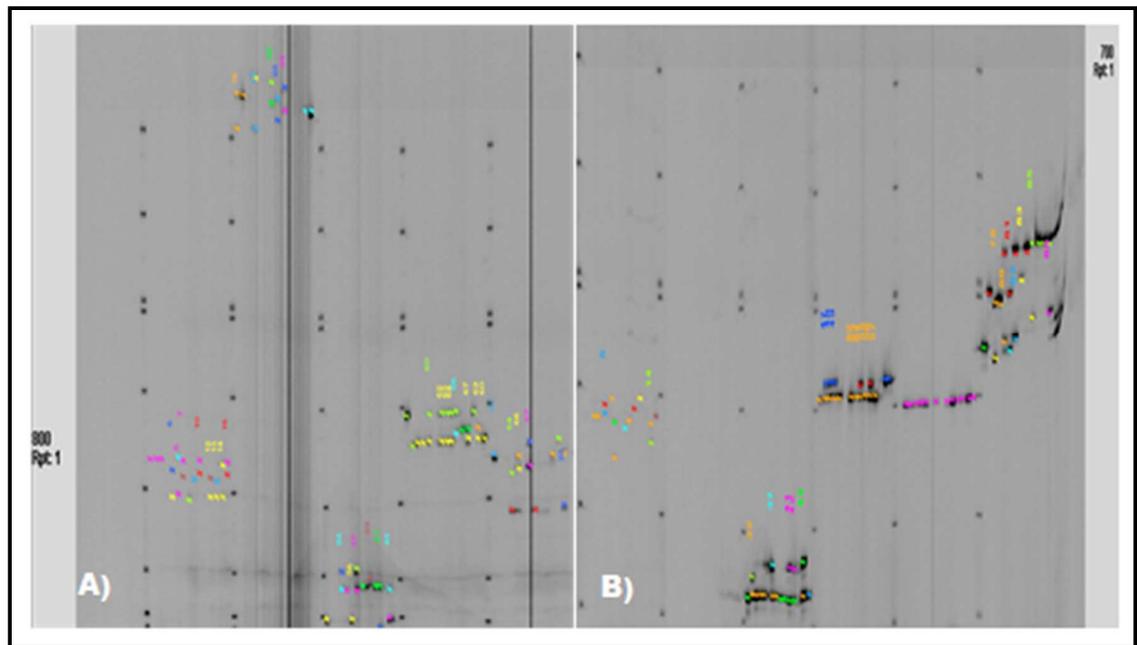


Figura 3.2. Genotipaje de las 7 muestras de canguil y 7 muestras de tusilla con 13 primers de maíz. A) Genotipado con primers phi: 083, 033, 015, 059, 034 en el rango de amplificación de 800 nm. B) Genotipado con primers phi: 072, 031, 011, 014, 002, 053 en el rango de amplificación de 700 nm.

Se realizó la matriz de datos genotípicos en Excel y se importó al programa PowerMaker3.0. En la Tabla 3.1 se observa el análisis estadístico de las muestras donde se detalla la información polimórfica de los primers.

Tabla 3.1: Diversidad genética y contenido de información polimórfica (PIC) para las 14 muestras de maíz con 13 primers SSR.

Primer	Diversidad genética	PIC
<i>phi072</i>	0,62963	0,58928
<i>phi031</i>	0,78571	0,75735
<i>phi011</i>	0,34375	0,30666
<i>phi014</i>	0,41319	0,32783
<i>phi02</i>	-	-
<i>phi053</i>	0,78402	0,76028
<i>phi083</i>	0,71181	0,66473
<i>phi033</i>	0,68750	0,65387
<i>phi015</i>	0,66500	0,61939
<i>phi059</i>	0,63018	0,55451
<i>phi034</i>	0,78125	0,74689
<i>phi050</i>	0,44444	0,34568
<i>phi041</i>	0,43388	0,39385
Promedio	0,56234	0,51695

El PIC de los primers phi: 072, 031, 083, 033, 015, 059, 034, 053, 050 son los más altos, mientras que el PIC de los primers phi: 011, 014, 002, 041 son bajos (Tabla 3.1). Por consiguiente para el estudio de diversidad genética de maíz se utilizó 9 primers microsatélites que reportaron PIC altos.

Al verificar el polimorfismo de los primers se realizó las combinaciones multiplex a la longitud de onda de 700 y 800 nm, con los primers 072, 031, 083, 033, 015, 059, 034, 053, 050. Estos datos se las presentan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Combinaciones de multiplex primer SSR para el genotipaje del Banco de Trabajo del Programa de Maíz.

Combinación	Primers SSR	Marcaje	Tamaño esperado (pb)*	Temperatura annealing (°C)
A	phi083 phi033	800nm	144-156	56
			259-287	56
B	phi015 phi059	800nm	102-126	56
			166-181	56
C	phi034 phi053 phi050	800nm	122-146	56
			188-214	56
			80-86	56
D	phi072 phi031	700nm	162-186	56
			206-244	56

*Tamaño esperado obtenidos en base de datos MaizGDB (Senior, 1998).

3.2.4. Amplificación de las variedades de canguil, tusilla y mezcla de maíz con reacciones dúplex y triplex con los 9 primers mediante la técnica M13-tailing SSR para el analizador LI-COR 4300

Una vez amplificadas las muestras con el coctel de reacción adecuado y el programa de PCR indicado se realizó la corrida de las 258 muestras de maíz en el LICOR 4300. Se obtuvo buenos patrones de amplificación en los rangos esperados tanto en los dúplex (A, B, D) como en el triplex (C). En la Figura 3.3 se puede observar la corrida de dúplex y triplex con las combinaciones descritas anteriormente.

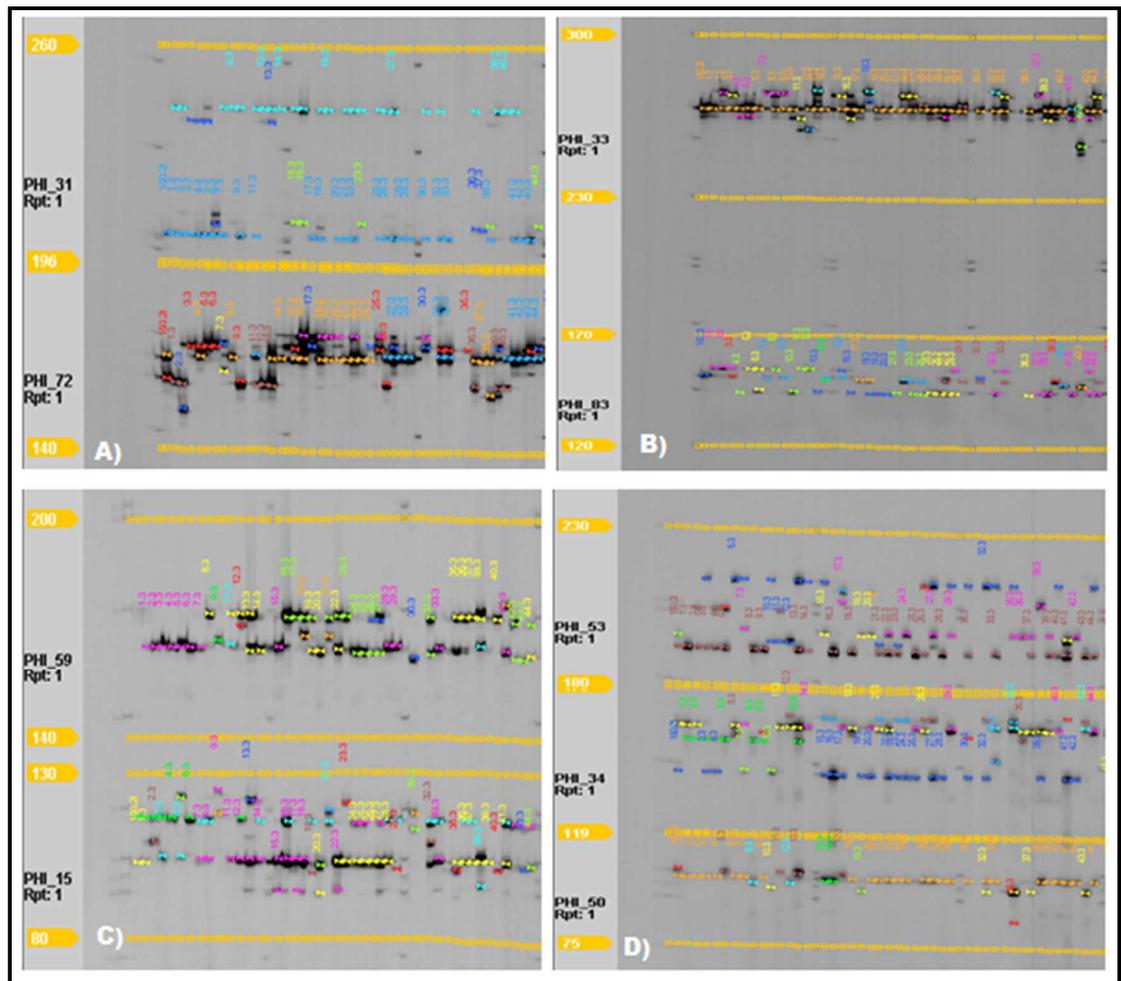


Figura 3.3. Corrida electroforética de muestras de maíz en el LICOR 4300 con las combinaciones dúplex y triplex. A) combinaciones de primer phi072 y phi031, B) combinaciones de primer phi083 y phi033, C) combinaciones de primer phi015 y phi059, D) combinaciones de primer phi034, phi050 y phi053.

En la Figura 3.4 se observa el triplex genotipado de las accesiones 1 a la 86, donde el primer phi050 es poco informativo pues en la mayor parte de las muestras es el mismo patrón de bandas. A diferencia de los primers phi053 y phi034 que en la mayoría de las muestras presentan alelos heterocigotos.

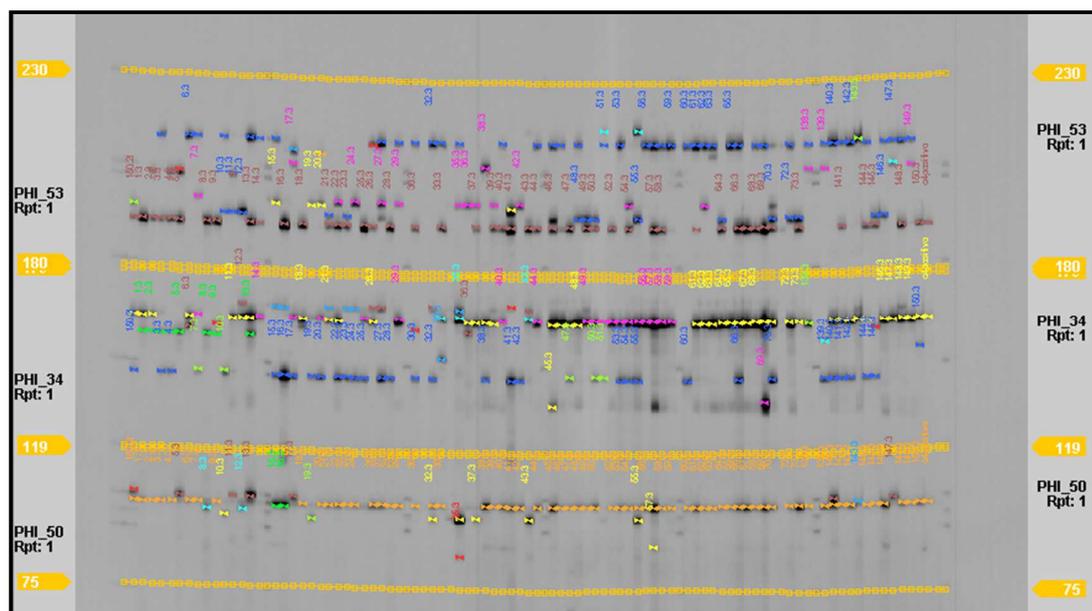


Figura 3.4. Lectura del imagen del gel de poliacrilamida observado en el asistente de lectura SAGA-GT Microsatellite versión 3.3. con la combinación triplex con las muestras de la 1-86.

3.2.5 Genotipaje de las accesiones del Banco de Trabajo del Programa de Maíz en el software SAGA-GT Microsatellite

De acuerdo a las combinaciones establecidas se realizó el genotipaje de las 258 muestras y se realizó el scoring en el software SAGA-GT Microsatellite versión 3.3. Se observó que las accesiones y las réplicas de cada primer tenían patrones definidos. En la Figuras 3.5 se observa algunos alelos obtenidos del genotipaje en el software SAGA-GT.

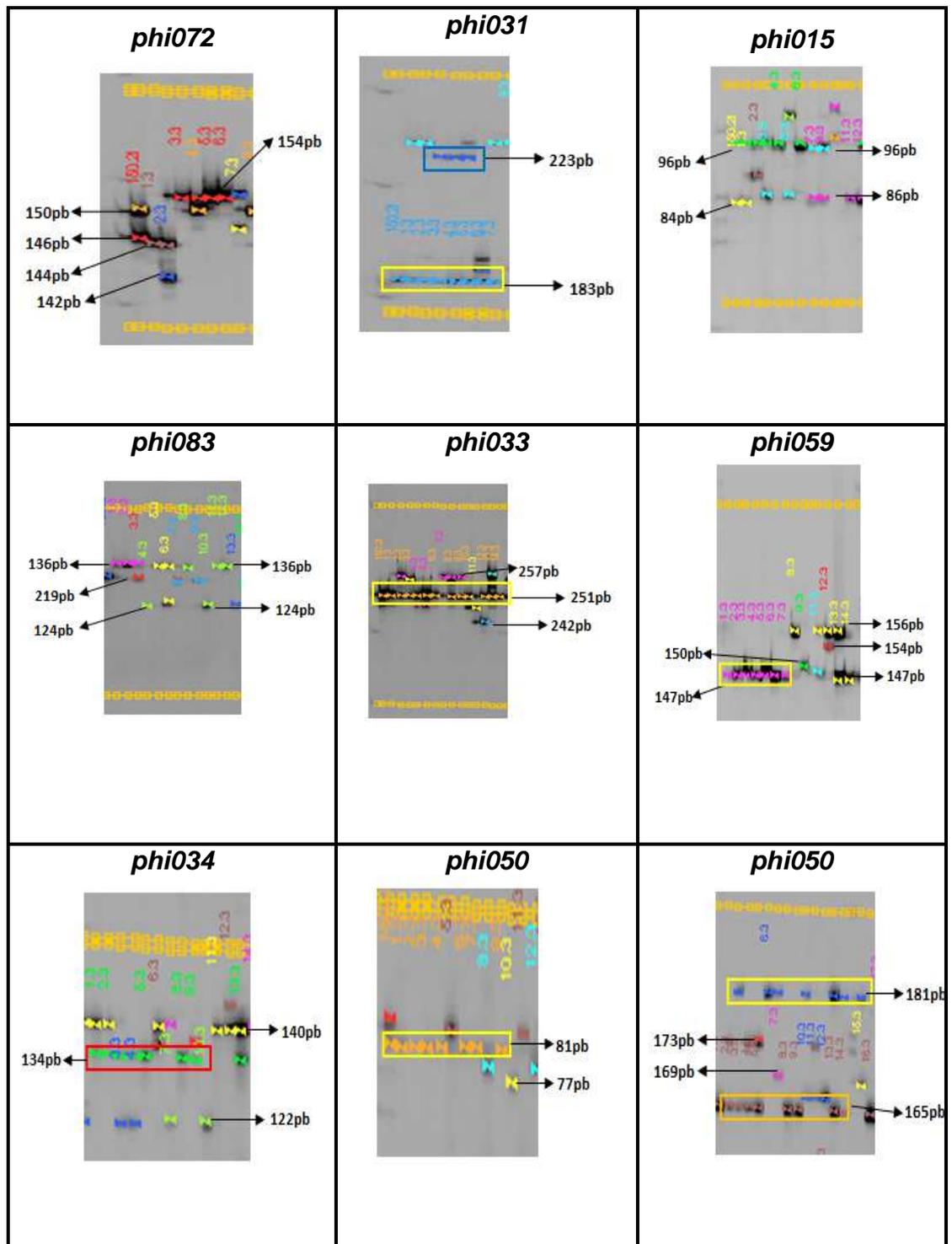


Figura 3.5. Imágenes de geles obtenidos SAGA-GT Microsatelite versión 3.3 con los dúplex A, B, D y el triplex C que indican algunos alelos correspondientes a la amplificación.

3.4. Análisis estadístico

La matriz genotípica final fue elaborada en el programa Excel a partir de la información proporcionada por los 9 loci microsatélites, posteriormente se la importó a los programas estadísticos para su análisis.

3.4.1. Análisis global de Diversidad Genética

En el análisis de diversidad genética se analizó a 86 individuos y sus respectivas replicas con 9 loci microsatélites en el programa PowerMarker3.0, se encontró un total de 72 alelos en toda la población estudiada, con un promedio de 8 alelos/locus, siendo un valor de riqueza media alélica significativamente alta. En la figura 3.6 se puede observar que el locus con mayor número de alelos (11) es el phi033, seguido del phi053 con 10; mientras que el locus con menor presencia alélica es el phi050 con 3 alelos, como se observa en la Figura 3.6. Los tamaños para estos alelos fluctúan entre 263 pb y 72 pb y el rango de diferencia de pares de bases entre alelos fluctúa de 3 a 4 pb.

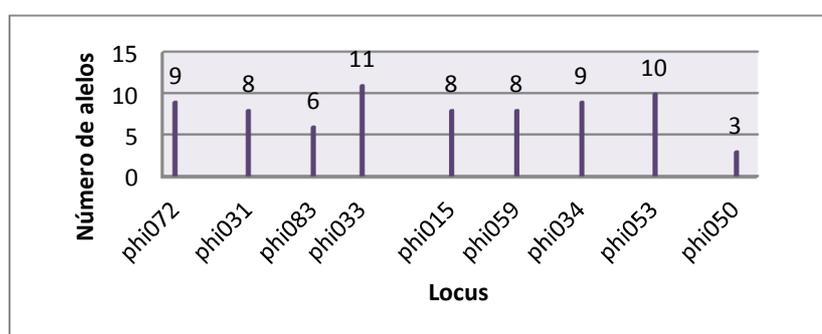


Figura 3.6. Número de alelos de 9 microsatélites utilizados en el genotipaje, para conocer la diversidad genética de maíz.

Las frecuencias alélicas para cada locus se detalla en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Alelos registrados con sus respectivas frecuencias para 86 materiales de maíz con 9 primers SSRs.

Locus	Tamaño reportado * (pb)	Tamaño encontrado (pb)	Número de alelos	Frecuencia
Primer phi072 (AAAC)	142, 146, 150, 158	134	9	0.008230
		138		0.004115
		142		0.111111
		146		0.022634
		150		0.541152
		154		0.279835
		158		0.028807
		162		0.002058
		170		0.002058
Primer phi031 (GTAC)	131, 203, 219, 223	147	8	0.004405
		183		0.548458
		187		0.145374
		191		0.074890
		195		0.002203
		211		0.004405
		219		0.026432
		223		0.193833
Primer phi083 (AGCT)	128, 132, 136	124	6	0.293981
		128		0.057870
		132		0.506944
		136		0.131944
		140		0.004630
		148		0.004630
		230		0.002049
		236		0.010246
Primer phi033 (AAG)	245, 251, 260, 263, 269	239	11	0.004098
		242		0.028689
		245		0.047131
		248		0.071721
		251		0.616803
		254		0.045082
		257		0.161885
		260		0.006148
		263		0.006148
		76		0.125506
		80		0.032389
Primer ph15 (AAAC)	84, 88, 92, 96, 100	84	8	0.004049
		88		0.012146
		92		0.342105
		96		0.117409
		100		0.022267
		104		0.344130

Tabla 3.3. Alelos registrados con sus respectivas frecuencias para 86 materiales de maíz con 9 primers SSRs.

Locus	Tamaño reportado * (pb)	Tamaño encontrado (pb)	Número de alelos	Frecuencia
Primer phi059 (ACC)	147, 153, 159, 162	141	8	0.004032
		144		0.302419
		147		0.260081
		150		0.064516
		153		0.155242
		156		0.187500
		159		0.018145
		162		0.008065
Primer phi034 (CCT)	128, 137, 146	116	9	0.006048
		119		0.016129
		122		0.231855
		128		0.002016
		131		0.008065
		134		0.034274
		137		0.149194
Primer phi050 (AAGC)	81, 85	140	3	0.475806
		143		0.076613
		77		0.089362
		81		0.853191
		85		0.057447
Primer phi053 (ATAC)	169, 185, 197	165	10	0.002049
		169		0.340164
		173		0.131148
		177		0.018443
		181		0.026639
		185		0.053279
	189	0.030738		
	193	0.379098		
	197	0.016393		
	201	0.002049		

Los alelos con mayor frecuencia alélica fueron: phi050 - 81 pb con un valor de 0.8531, phi033 - 251 pb con un valor de 0.6168, phi031 - 183 pb con un valor de 0.5484 y phi072- 150 pb con un valor de 0.5411. Mientras que los alelos que tuvieron menor frecuencia alélica fueron: phi072 – 162 pb, phi072 –170 pb, phi033 – 230 pb y phi033 – 165 pb, 201 pb, phi034 – 128 con un valor de frecuencia de 0.0020 cada uno, phi031 – 162 pb con 0.0022.

3.4.2. Parámetros de diversidad genética

En la Tabla 3.4 se registra una media de 0.5076 en el parámetro de mayor frecuencia de alelos, lo que indica el número de veces que un alelo se presenta dentro del número total de alelos en la población. En promedio se analizó 93,35% de las accesiones de maíz. El número de genotipos se encuentran en un rango de 5 el más bajo y 27 el más alto y se obtuvo un promedio de genotipos de 18.56, obteniendo una mayor cantidad de genotipos en el locus phi053 con 27 genotipos encontrados. En cuanto a la media de la heterocigosidad esperada (H_e), se tiene un valor de 0,6275 siendo el loci phi059 que reportó el valor más alto de 0.7771. La heterocigosidad observada (H_o) tuvo una media de 0.4587, considerado un valor medio debido a la naturaleza alógama de reproducción del maíz. Además en la tabla 3.4 se puede observar que la heterocigosidad observada es menor que la esperada. El valor PIC promedio fue de 0.5869 siendo los loci phi: 059, 015, 053, 034 los que mostraron mayor PIC con valores de 0.7421, 0.6903, 0.6732, 0.6489 respectivamente.

Tabla 3.4. Parámetros de diversidad genética de 258 muestras de *Zea mays* con 9 primers SSRs.

Locus	MFA	No. Gn	TM	No. Ob	No. Alelos	He	Ho	PIC
<i>phi072</i>	0.5412	16	256	243	9	0.6151	0.5844	0.5589
<i>phi031</i>	0.5485	17	256	227	8	0.6341	0.5242	0.5927
<i>phi083</i>	0.5069	12	256	216	6	0.6358	0.3333	0.5770
<i>phi033</i>	0.6168	26	256	244	11	0.5829	0.4754	0.5544
<i>phi015</i>	0.3441	22	256	247	8	0.7333	0.5628	0.6903
<i>phi059</i>	0.3024	22	256	248	8	0.7771	0.4758	0.7421
<i>phi034</i>	0.4758	20	256	248	9	0.6902	0.4597	0.6489
<i>phi050</i>	0.8532	5	256	235	3	0.2608	0.0894	0.2443
<i>phi053</i>	0.3791	27	256	244	10	0.7183	0.6230	0.6732
Promedio	0.5076	18.5556	256	239	8	0.6275	0.4587	0.5869

MFA: mayor frecuencia alélica; Gn: genotipos; TM: Tamaño de la muestra; Ob: observaciones; He: heterocigosis esperada; Ho: heterocigosis observada; PIC: Contenido de información polimórfica

3.4.3. Estructura genética

3.4.3.1. Análisis de Agrupamiento

Para este análisis se utilizó el método UPGMA donde se construyó un dendrograma el cual representa las relaciones genéticas entre las accesiones. Para construir el árbol filogenético se utilizó el programa PowerMaker3.0, este paquete estadístico utiliza una matriz de distancias genéticas individuales escogiendo la opción de alelos compartidos (Shared Allele Distance, DAS). El

cálculo de la distancia genética entre dos poblaciones da una estimación relativa del tiempo que ha transcurrido desde que las poblaciones se han establecido.

El dendograma UPGMA (Figura 3.7) nos indica la relación que existe entre las diferentes variedades de maíz. Se observó que las variedades canguil blanco, canguil rojo y canguil mixtura están estrechamente relacionados. Por otra parte la variedad tusilla y tusilla mixtura se encuentran emparentadas en un mismo grupo.

Entre las accesiones del austro (accesión desde la 35 a la 86 detalladas en el ANEXO A), de igual se distinguen dos grandes grupos en los cuales se observa relación genética con las variedades INIAP 111, INIAP 122, INIAP 102 e INIAP 124.

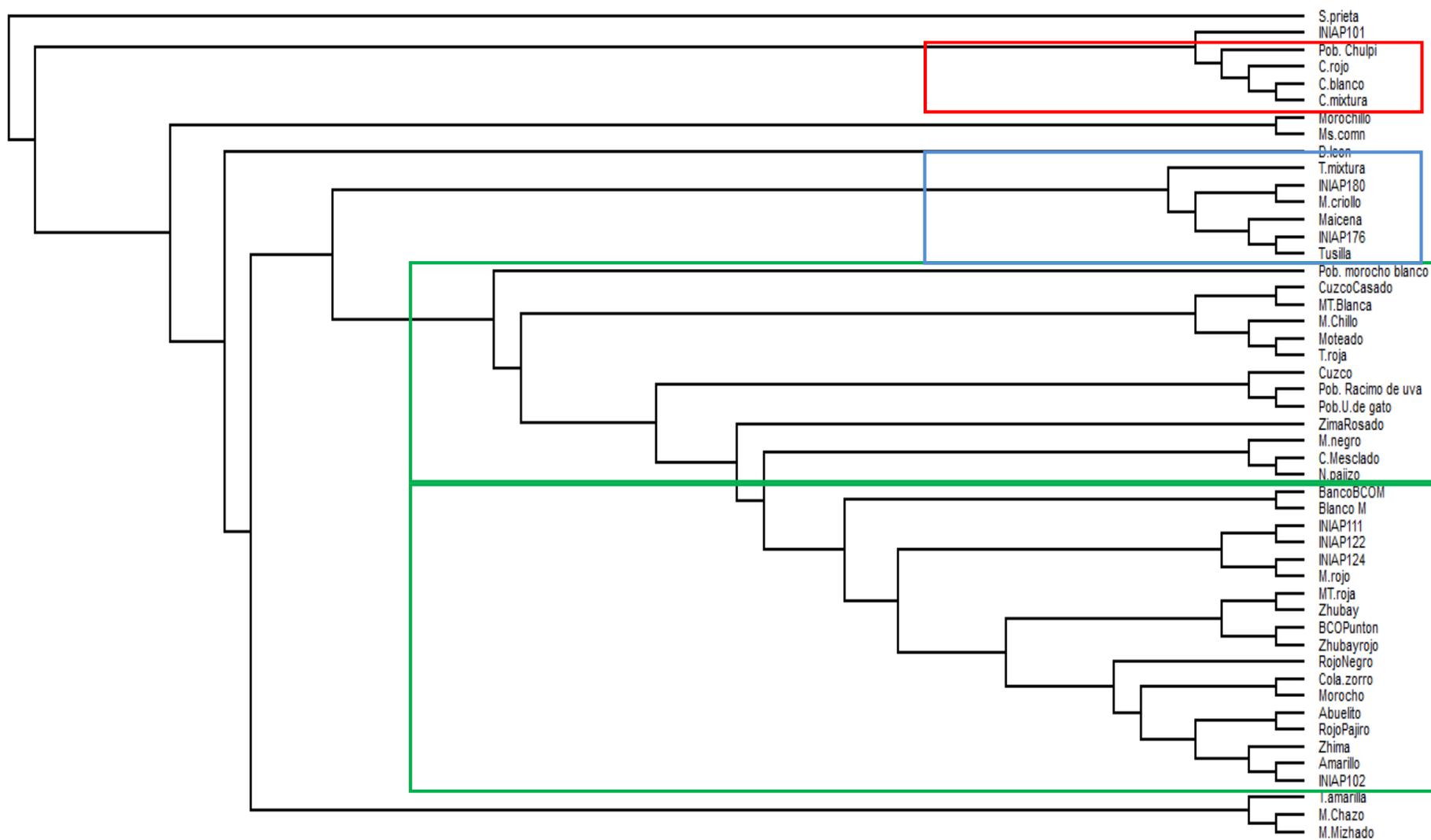


Figura 3.7. Dendrograma UPGMA basado en la distancia Shared Allele Distance, DAS que indica las accesiones de *Zea mays*.

Mediante el análisis de coordenadas principales se obtuvieron los ejes de varianza con los valores Eigen (Tabla 3.5), los cuales indican el porcentaje individual y acumulado de la variabilidad que se encuentra en cada una de las coordenadas.

Tabla 3.5: Valores eigen obtenidos a partir del análisis de coordenadas principales de 258 muestras de maíz analizado con 9 primers microsatélites.

I	Valor Eigen	Porcentaje	Acumulado
1	5.06939779	10.5182	10.5182
2	2.83398610	5.8801	16.3983
3	2.51605194	5.2204	21.6187

El valor eigen para el primer eje x es de 10.51 % de varianza, y para el segundo eje dio un valor de 5.88% lo que nos da un índice de variabilidad total de 16.39%. Estos resultados confirman la falta de estructuración, sin embargo contribuyen a la discriminación de los genotipos en los ejes de coordenadas.

En la Figura 3.9, el análisis de coordenadas principales presenta una tercera coordenada que muestra un 5.22% de variabilidad adicional. Según los datos de la Tabla 3.5 se observa un acumulado de 21.61% de la variabilidad total.

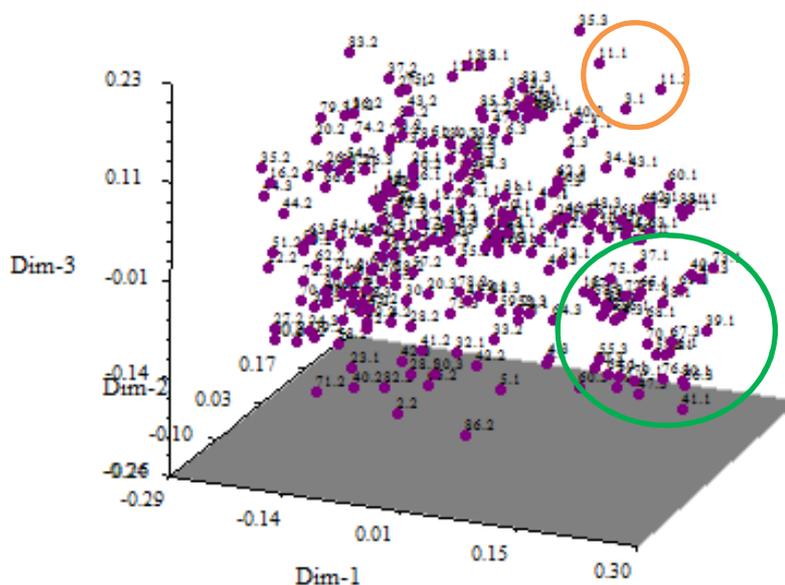


Figura 3.9. Análisis de coordenadas principales (PCO) de 258 muestras de maíz analizados con 9 primers SSRs, visto en tres coordenadas.

En este gráfico se puede apreciar la distribución espacial de las 258 muestras, en la cual se distingue la separación clara de las accesiones del austro y canguil claramente distinguidas en el dendrograma UPGMA de la Figura 3.7.

3.5. Análisis estadístico de diversidad genética por razas y mezclas de maíz

Se elaboró dos matrices genotípicas en el programa Excel, la primera con las razas de canguil y tusilla, mientras que la segunda fueron las mezclas de maíz pertenecientes al Banco de Trabajo del Programa de Maíz. A partir de la

información proporcionada por los 9 loci microsatélites, posteriormente se la importó a los programas estadísticos para su análisis.

3.5.1. Canguil y Tusilla

3.5.1.1. AMOVA

Se construyó una matriz de distancia para las accesiones de canguil y tusilla a partir de la matriz genotípica de datos. Se utilizó el paquete estadístico GenAlex6.5 y por medio de la opción AMOVA se llevó a cabo el análisis de varianza molecular. Por medio de este análisis se logró estimar y comparar la variación dentro y entre individuos de la población en estudio, expresado en porcentaje para cada una de las fuentes de variación como se detalla en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6: Análisis de varianza molecular para 34 accesiones de *Zea mays* con 9 primers SSRs.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Variación estándar	Porcentaje
<i>Entre razas</i>	33	174.887	5.300	0.216	7%
<i>Entre Individuos</i>	68	272.333	4.005	1.020	32%
<i>Dentro de cada Individuo</i>	102	200.500	1.966	1.966	61%
Total	203	647.721		3.201	100%

Con este análisis se observó un nivel de significancia de $p=0.001$, con el cual se obtuvo un índice de diferenciación genética de 7% entre la población, además

de 32% de la diversidad entre individuos y 61% de variación dentro de cada individuo. Se observa que la variación genética está distribuida heterogéneamente siendo el mayor porcentaje de diversidad dentro de cada individuo.

La variación molecular de las razas canguil y tusilla que se observa en la Figura 3.10, donde se detalla el porcentaje de variación que existe entre las razas. Claramente se observa que el mayor porcentaje (61% de color verde) es dentro de cada individuo, mientras que el menor porcentaje (7% de color azul) es entre las razas canguil y tusilla.

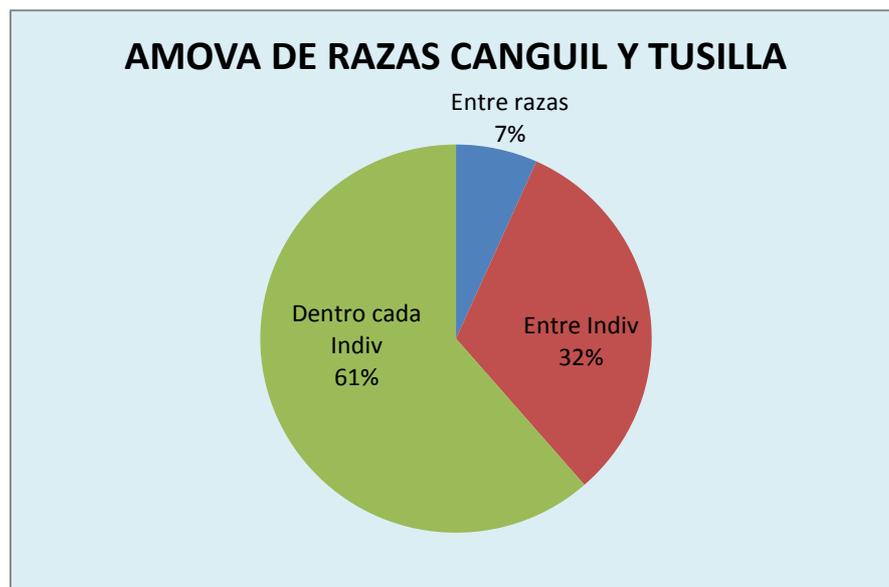


Figura 3.10. Porcentajes obtenidos en el AMOVA de las razas canguil y tusilla de 100 muestras con 9 primers SSRs.

3.5.1.2. Estadística F

Las estadísticas F obtenidos en el software GenAlex6.5 indican un valor F_{st} (coeficiente de coancestro) de 0.290 y un F_{is} (coeficiente de consanguinidad o endogamia intrapoblacional) de 0.005, valores significativos al 95%. Esto nos quiere decir que el 29% de la variación genética observada corresponde a diferencias entre variedades y un valor F_{is} de 0.5% determina el porcentaje de variación dentro de cada variedad. En la Tabla 3.7 se muestra el cálculo de los parámetros F para las variedades canguil y tusilla obtenidas mediante el análisis polimórfico.

Tabla 3.7: Cálculo de parámetros F para las variedades de canguil y tusilla obtenidas del análisis de polimorfismo de 9 primers SSR.

Locus	Fis	Fit	Fst	Nm
<i>phi072</i>	-0.235	0.145	0.308	0.563
<i>phi031</i>	-0.280	0.064	0.269	0.679
<i>phi083</i>	0.091	0.528	0.480	0.270
<i>phi033</i>	0.097	0.291	0.215	0.915
<i>phi015</i>	-0.028	0.189	0.211	0.934
<i>phi059</i>	0.107	0.361	0.284	0.629
<i>phi034</i>	0.027	0.274	0.254	0.735
<i>phi050</i>	0.396	0.593	0.327	0.515
<i>phi053</i>	-0.131	0.167	0.263	0.699
Promedio	0.005	0.290	0.290	0.660

Según las circunstancias de equilibrio Hardy y Weinberg, existe un bajo índice en presencia de heterocigotos con respecto a lo esperado, debido a que los valores F_{is} para la mayor parte de loci fueron positivos, excepto para los loci *phi072*, *phi031*, *phi015*, *phi053* que dieron valores negativos de -0.235, -0.280, -

0.028 y -0.131 respectivamente, lo cual nos indica que existe predominancia de heterocigotos en estos loci.

El valor del flujo genético indica el número de organismos que llegan a una población y se incorporan a su diversidad génica, es un número absoluto y no es necesario conocer el tamaño efectivo de los alelos (Eguiarte *et al.*, 2010). El valor promedio obtenido fue de 0.660 que indica el número de migrantes efectivos en las dos razas.

3.5.1.3. Distancia genética Nei

Si las frecuencias alélicas son idénticas entonces $I=1$ (identidad máxima posible), mientras si no comparten ningún alelo $I=0$ (identidad mínima posible). En el análisis realizado la mayor similitud se observó para las variedades de tusilla de Manabí con tusilla de Napo con una distancia de 0.998, mientras que la menor similitud se observó en las variedades de tusilla de Orellana con tusilla de Sucumbíos con una distancia de Nei de 0.099. Los valores se detallan en la matriz de distancia genética de Nei en el ANEXO E.

3.5.2. Mezclas de maíz

3.5.2.1. AMOVA

Se construyó una matriz de distancia para las accesiones pertenecientes al Banco de Trabajo del Programa de Maíz (desde la accesión 35 a la 86 detallado en el ANEXO A) a partir de la matriz genotípica de datos. Se obtuvo la estimación y comparación de la variación molecular dentro y entre individuos de la población en estudio con una significancia de $p=0.001$, donde se determinó que el 4% de la variación es entre variedades, el 30% de la diversidad aporta a la diferenciación entre individuos, mientras que el 66% de la variación es dentro de cada individuo. Estos valores se detallan en la Tabla 3.8

Tabla 3.8. Análisis de varianza molecular para 52 accesiones de *Zea mays* con 9 primers SSRs.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Variación estándar	Porcentaje
<i>Entre variedades</i>	51	218.689	4.288	0.108	4%
<i>Entre Individuos</i>	104	378.500	3.639	0.871	30%
<i>Dentro de cada Individuo</i>	156	296.000	1.897	1.897	66%
Total	311	893.189		2.877	100%

La variación molecular de las mezclas de maíz que se observa en la Figura 3.11, donde se detalla el porcentaje de variación que existe entre las mezclas. Claramente se observa que el mayor porcentaje (66% de color verde) es dentro de cada individuo, mientras que el menor porcentaje (4% de color azul) es entre

las variedades de maíz pertenecientes al Banco de Trabajo del Programa de Maíz.

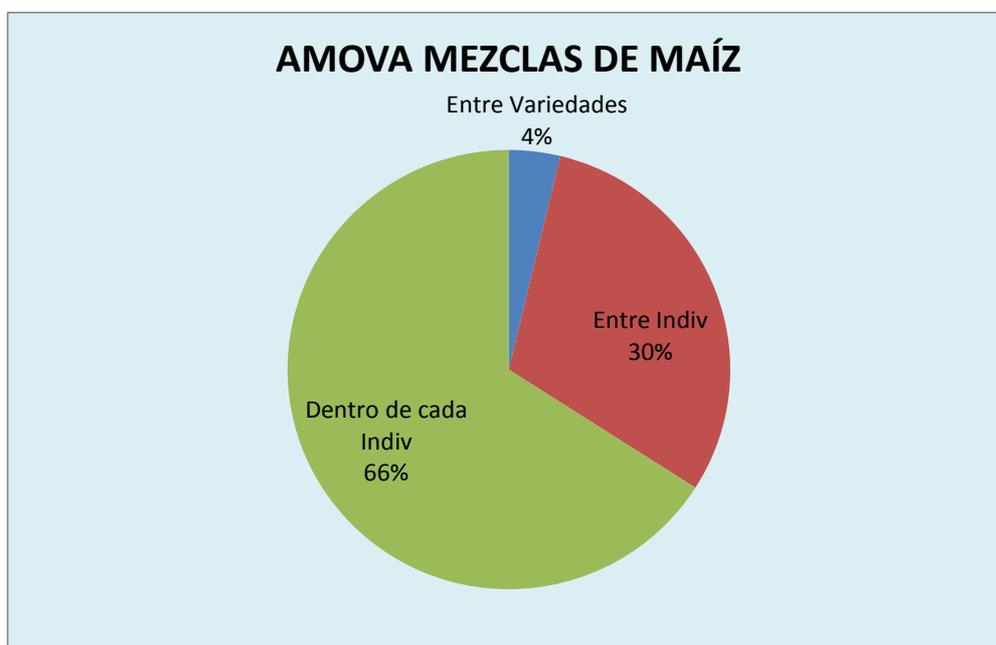


Figura 3.11. Porcentajes obtenidos en el AMOVA de las mezclas de maíz de 123 muestras con 9 primers SSRs.

3.5.2.2. Estadística F

En las estadísticas F obtenidos con una significancia del 95% indican un valor F_{st} de 0.284 y un F_{is} de 0.018, esto nos indica que el 28.4% de la variación genética observada corresponde a diferencias entre variedades. Un valor de F_{is} de 1.8% determina el porcentaje de variación dentro de cada variedad (Tabla 3.9).

Tabla 3.9: Cálculo de parámetros F para las mezclas de maíz obtenidas del análisis de polimorfismo de 9 primers SSR.

Locus	Fis	Fit	Fst	Nm
<i>phi072</i>	-0.305	-0.015	0.222	0.874
<i>phi031</i>	-0.187	0.261	0.378	0.412
<i>phi083</i>	0.059	0.395	0.356	0.452
<i>phi033</i>	-0.228	0.085	0.255	0.729
<i>phi015</i>	0.054	0.238	0.194	1.040
<i>phi059</i>	0.247	0.387	0.186	1.096
<i>phi034</i>	0.181	0.333	0.186	1.097
<i>phi050</i>	0.475	0.773	0.568	0.190
<i>phi053</i>	-0.137	0.108	0.215	0.911
Promedio	0.018	0.285	0.284	0.756

Se observó un bajo índice de heterocigotos a excepción de los loci *phi072*, *phi031*, *phi033*, *phi053* que dieron valores negativos en el coeficiente de consanguinidad o endogamia intrapoblacional de -0.305, -0.187, -0.228 y -0.137 respectivamente, lo cual nos indica que existe predominancia de heterocigotos. Además se observó que con el locus *phi072* se obtuvo un valor de -0.015 en el coeficiente de coeficiente de coancestro indicando predominancia de heterocigotos.

3.5.2.3. Distancia genética Nei

Si las frecuencias alélicas son idénticas entonces $I=1$ (identidad máxima posible), mientras si no comparten ningún alelo $I=0$ (identidad mínima posible). En el análisis realizado la mayor similitud se observó para las variedades de Sal prieta y Rojo Pajiro con una distancia de 0.977, mientras que la menor similitud

se observó en las variedades Rojo Pajiro y Abuelito con una distancia de Nei de 0.043. Los valores se detallan en la matriz de distancia genética de Nei en el ANEXO F.

3.6. Estimaciones y medidas de confianza por re-muestreo

Para este análisis mediante el software InfoGen se consideró a tres poblaciones: Canguil (Pob1), Tusilla (Pob2) y Mezclas de maíz (Pob3). Los métodos de re-muestreo fueron empleados para comparar estadísticos. Se consideró el análisis Bootstrap pues proporciona estimaciones empíricas de parámetros genéticos y de los errores estándares.

En el análisis con el software Infogen se obtuvieron tres tablas, en la primera (Tabla 3.10) se muestra el valor de la medida de variabilidad seleccionada obtenido a partir de la muestra original sin el uso de re-muestreo.

Tabla 3.10: Medida de variabilidad seleccionada obtenido a partir de la muestra original sin el uso de re-muestreo para 3 poblaciones con 9 primers SSR.

Locus	Estadístico	Pob1	Pob2	Pob3
<i>phi072</i>	Diversidad genética	0.727	0.667	0.607
<i>phi031</i>	Diversidad genética	0.649	0.740	0.649
<i>phi083</i>	Diversidad genética	0.724	0.710	0.667
<i>phi033</i>	Diversidad genética	0.670	0.668	0.571
<i>phi015</i>	Diversidad genética	0.707	0.610	0.774
<i>phi059</i>	Diversidad genética	0.726	0.748	0.796
<i>phi034</i>	Diversidad genética	0.750	0.732	0.634
<i>phi050</i>	Diversidad genética	0.560	0.363	0.309
<i>phi053</i>	Diversidad genética	0.767	0.732	0.371

En la segunda (Tabla 3.11) la estimación de dicha medida vía el método de estimación por bootstrap.

Tabla 3.11: Estimaciones puntuales por Bootstrap para medidas de diversidad genética por locus.

Locus	Estadístico	Pob1	Pob2	Pob3
<i>phi072</i>	Diversidad genética	0.713	0.659	0.605
<i>phi031</i>	Diversidad genética	0.646	0.730	0.646
<i>phi083</i>	Diversidad genética	0.708	0.699	0.665
<i>phi033</i>	Diversidad genética	0.660	0.659	0.570
<i>phi015</i>	Diversidad genética	0.697	0.603	0.772
<i>phi059</i>	Diversidad genética	0.714	0.741	0.793
<i>phi034</i>	Diversidad genética	0.738	0.725	0.633
<i>phi050</i>	Diversidad genética	0.549	0.349	0.308
<i>phi053</i>	Diversidad genética	0.756	0.723	0.715

En la tercera tabla (Tabla 3.12) consta la medida de confiabilidad (EE) para la estimación obtenida por bootstrap.

Tabla 3.12: Errores estándares por bootstrap para medidas de diversidad genética por locus.

Locus	Estadístico	Pob1	Pob2	Pob3
<i>phi072</i>	Diversidad genética	0.029	0.033	0.024
<i>phi031</i>	Diversidad genética	0.035	0.021	0.029
<i>phi083</i>	Diversidad genética	0.033	0.022	0.026
<i>phi033</i>	Diversidad genética	0.049	0.042	0.035
<i>phi015</i>	Diversidad genética	0.029	0.030	0.011
<i>phi059</i>	Diversidad genética	0.032	0.025	0.012
<i>phi034</i>	Diversidad genética	0.024	0.021	0.027
<i>phi050</i>	Diversidad genética	0.065	0.067	0.046
<i>phi053</i>	Diversidad genética	0.034	0.029	0.017

Para la población Canguil (Pob1) el Locus phi053 presentó el mayor porcentaje de loci polimórfico observado con 76.7%, a través de la estimación por Bootstrap se obtuvo que dicha medida es 75.6% con un error estándar del 0,034. Para la población Tusilla (Pob2) el Locus phi059 presentó el mayor porcentaje de loci polimórfico observado con 74,8%, a través de la estimación por Bootstrap se obtuvo que dicha medida es 74,1% con un error estándar del 0,025. Para la población de mezclas de maíz (Pob3) el Locus phi059 presentó el mayor porcentaje de loci polimórfico observado con 79,6%, a través de la estimación por Bootstrap se obtuvo que dicha medida es 79,3% con un error estándar del 0,012.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

4.1. Caracterización molecular

La caracterización molecular de cultivares de maíz tiene una importante aplicación práctica en el mejoramiento vegetal, pues permite identificar genotipos potencialmente comerciales y relaciones genéticas existentes entre las poblaciones (Bonamico *et al.*, 2004). Al aplicar esta técnica de detección a nivel de ADN, permite contrastar las diferencias en las secuencias, los cuales evitan que el efecto del ambiente enmascare la variabilidad (Escobar, 2006). En este estudio fueron utilizados marcadores moleculares microsatélites (SSR) para caracterizar razas de maíz colectadas en el Ecuador, con el fin de determinar las diferencias y similitudes entre genotipos.

Al realizar la extracción de ADN de maíz se obtuvo excelentes resultados con el protocolo de Ferreira y Grattapaglia (1998), debido al rendimiento y limpieza de las muestras. Se pudo observar que el buffer de extracción (el cual contiene antioxidantes β -mercaptoetanol que permiten la inactivación de proteínas por reducción de los puentes disulfuro) fue de gran importancia para obtener una buena calidad en el ADN; además del uso del agente quelante EDTA que captura los iones magnesio presentes en el medio, evitando la acción de enzimas que degradan al ADN (Rocha, 2002). Adicionalmente, este protocolo tiene como

ventaja ser rápido y económico, por lo cual fue el método adoptado para el trabajo experimental.

En la cuantificación de ADN genómico de maíz en el espectrofotómetro EPOCH, se pudo determinar que este método es de lectura directa. Siendo un método muy preciso permite realizar diluciones de ADN a concentraciones más exactas. Además, permite cuantificar un gran número de muestras con índices bajos de error. Por lo que resultó conveniente emplearlo en el presente estudio.

En la selección de primers con la técnica M13-Tailing SSR para el genotipaje de maíz Azofeifa (2006) indica que, el uso de marcadores moleculares polimórficos es importante pues son regiones altamente variables que pueden estar presentes en todo el genoma; dichos marcadores moleculares son útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas. Con el screening de 13 primers almacenados en el Departamento Nacional de Biotecnología del INIAP, se utilizó 9 primers SSR para el presente estudio de diversidad genética de maíz, estos primers presentaron un alto índice de polimorfismo con las muestras de canguil y tusilla analizadas.

El maíz es una especie diploide con un set de 10 cromosomas y un número cromosómico de $2n=20$ (Flores, Olivares, & Flores, 2005). En el presente estudio se realizó el genotipaje de las razas canguil, tusilla y mezclas de maíz mediante el LICOR 4300, donde se identificó la presencia de dos bandas para individuos heterocigotos y de una banda en individuos homocigotos, en cada locus. El LI-

COR 4300 es un equipo de alta especificidad pues permite la identificación de alelos que varíen en 2 pares de bases (pb) (LI-COR Biosciences, 2012); mientras que, en geles de acrilamida se diferencian en 20 pb y los geles de agarosa que difieren en 50 pb. Por lo cual, al emplear la técnica de genotipaje en el analizador LICOR 4300, permite la detección eficaz del número total de alelos de la población en estudio (Del Villar & Reynoso, 2010).

4.2. Diversidad genética del maíz

En la caracterización y agrupamiento de las razas de canguil, tusilla y mezclas de maíz pertenecientes al Programa de Maíz del INIAP con 9 primers SSR se observó un total de 72 alelos con un promedio de 8 alelos/locus. Presentando valores más altos que los registrados por Gonzáles, Hernández, & Alezones (2009) donde se analizó 37 líneas de maíz blanco con 13 pares de SSR y se obtuvo un total de 25 alelos con un promedio de 2.08 alelos/locus. En contraste, en el presente estudio se observaron valores más bajos comparados con el de diversidad genética en poblaciones de maíz (*Zea mays* L.) evaluadas con microsatélites realizado por Bedoya (2012). En donde se obtuvo un total de 291 alelos con 28 SSRs utilizados en 194 poblaciones de germoplasma Latinoamericano (con variedades utilizadas en el presente estudio), con un promedio de 10.39 alelos por locus. Las causas de estas diferencias pueden atribuirse al tamaño de la muestra y la variabilidad de las líneas en análisis, además probablemente al número de marcadores SSR utilizados y al nivel de polimorfismo que poseen.

En el trabajo realizado por Peñaranda & Navas (2005) se encontró alta divergencia en 24 líneas de maíz criollo con 90 primers SSR. Donde se obtuvo un total de 391 bandas, y el nivel de polimorfismos osciló entre 2 y 9 alelos por SSR. En los trabajos de investigación en maíz realizados en el Ecuador por parte del Programa de Maíz, se encontró 74 alelos con un promedio de 8 alelos por SSR Morales (2003). De igual manera en el estudio realizado por Jacho (2009) sobre Caracterización molecular de 27 accesiones de maíz chulpi (*Zea mays* L.) y 65 accesiones de maíz negro colectadas en la serranía del Ecuador, se obtuvo un total de 278 alelos con un promedio de 7 alelos por locus. Los datos obtenidos en las investigaciones anteriores revelan que son similares al obtenido en el presente estudio, debido al uso de primers SSR polimórficos.

En el estudio realizado por Garrido (2010) sobre Caracterización molecular de la colección núcleo de maíz (*Zea mays*) de altura del banco de germoplasma del INIAP mediante 13 marcadores moleculares microsatélites en 136 accesiones, se obtuvo un total de 90 alelos con un promedio de 8 alelos/locus. Se evidencia de igual forma que la investigación mencionada anteriormente posee valores similares a los obtenidos, debido al uso de variedades de maíz y primers similares al presente estudio.

Los locus con mayor número de alelos obtenido en el presente estudio son phi033, phi053, phi034 y phi072, siendo mayormente polimórficos (por lo cual son óptimos para los análisis de diversidad genética). Mientras que, los locus phi083

y phi050 proyectaron menor polimorfismo (es decir mayor cantidad de alelos repetidos y de tamaños similares siendo poco informativos).

Las frecuencias alélicas oscilaron 0.0022 a 0.8531, observándose la mayor frecuencia alélica el locus phi50- 81 pb. Si la frecuencia de un alelo es muy alta, existe poca heterocigosidad (Galindo & Milagro, 2011). En este estudio se observó que el alelo 81 tenía un alto grado de repetitividad; mientras que, 38 alelos (26,6%) pueden ser considerados como raros con frecuencias alélicas menores a 0.05. Datos que poseen similitud en el estudio reportado por Morales (2003) con frecuencias alélicas en un rango que oscila entre 0.0079 el más bajo y 0.8571 el más alto.

La heterocigosidad observada (H_0) para los materiales en estudio fue de 0.4587; mientras que, la heterocigosis esperada (H_e) fue de 0.6275, resultados que concuerdan con los datos obtenidos en el trabajo de Caracterización molecular de la colección núcleo de maíz de altura del banco de germoplasma del INIAP mediante marcadores moleculares microsatélites (Garrido, 2010). En dicho trabajo se obtuvo una heterocigosidad observada de 0.3665 y una heterocigosidad esperada de 0.6549. Los valores obtenidos indican que bajo la hipótesis de Hardy-Weinberg las accesiones en estudio no se encuentran en equilibrio. Esto debido a que el maíz es un cultivo anual anemófilo; considerado de fecundación predominantemente cruzada, factor que promueve la variabilidad genética existente en la población. Este proceso favorece a que determinados

individuos se reproduzcan más que otros, generando que las frecuencias alélicas y genotípicas varíen alterando el equilibrio génico (Bracco *et al.*, 2013).

El valor del índice de polimorfismo contenido (PIC) osciló en un rango de 0.2443 y 0.7421, con un promedio de 0.58 para los 9 marcadores microsatélites utilizados. El promedio de la medida de PIC obtenido en este estudio fue similar al reportado por (Bravo, 2009), en el cual su rango varía entre 0.30 y 0.83, obteniendo una media de 0.59. El PIC obtenido indica gran diversidad genética en las accesiones analizadas (Canguil, Tusilla y mezclas de maíz), pues poseen características particulares de cada zona de origen. En el trabajo realizado por Garrido (2010) el locus con mayor polimorfismo fue phi002 con un valor de 0.72; mientras que, el presente estudio se descartó debido a que presentó un patrón monomórfico en pruebas preliminares. En contraste, el locus con mayor polimorfismo en este estudio fue phi 059, con un valor de 0.74 similar al reportado por Garrido (2010) con un valor de 0.70. Por otro lado el trabajo realizado por González, Hernández, & Alezones (2009) reporta un PIC que oscila entre 0.03 y 0.57, con una media de 0.41, siendo menor al obtenido en este estudio (0.59) (posiblemente debido al número de muestras analizadas).

El maíz es una planta alógama (es decir que puede presentar polinización cruzada y fecundación entre individuos genéticamente diferentes); por lo cual presenta un alto grado de heterocigosis, generando plantas con un mejor rendimiento que los parentales (Acquaah, 2007; Cerda, 2011). En este estudio, al realizar la estructura genética de las especies de maíz se puede esperar que

las variedades analizadas hayan sido obtenidas por autopolinización o por polinización cruzada. Al ser colectas realizadas por parte del Programa de Maíz del INIAP en diferentes provincias, el material vegetal para la conservación de la especie (semilla) depende de: la tasa de erosión genética diferencial, con cuellos de botella más severos o regímenes selectivos más estrictos para las poblaciones; debido a las preferencias de los agricultores y a condiciones ambientales adversas (Bracco *et al.*, 2013).

De acuerdo al análisis de agrupamiento UPGMA, existe relación entre las diferentes variedades de canguil (blanco, rojo y mixtura), ya que presentan coeficientes de distancia cercanos a 0 (ANEXO F). Además, en el análisis realizado se obtuvo que estas variedades tenían relación con la población chulpi. Dicha población se encuentra ubicada principalmente en la Sierra ecuatoriana (provincias Chimborazo y Pichincha); al igual que las colectas de canguil obtenidas de las provincias de Carchi, Imbabura y Cotopaxi. En el caso de la variedad tusilla, no se encuentra agrupada uniformemente, debido a la polinización cruzada que pudieron haber sufrido los materiales en estudio (perdiendo de esta manera su estructura genética).

En el caso de las mezclas de maíz provenientes de colectas del austro y del Banco de Trabajo del Programa de Maíz, se observó la conformación de dos grupos; en los cuales, debido al flujo genético existe gran diversidad de genotipos en los individuos de investigación. Además, como menciona Bracco *et al.*, (2013) las poblaciones de maíz están sujetas a procesos de deriva, migración y a la

selección (tanto natural como artificial). Por lo cual, es de gran importancia conocer cómo evoluciona este sistema; analizar la dinámica poblacional directamente en los campos de los cultivadores, y el impacto de sus prácticas en la determinación de la estructura y diversidad poblacional.

En el análisis de coordenadas principales (PCO), se presentó una variabilidad acumulada de 21.62%. Debido a esto no hay formación de estructuras definidas. Sin embargo, se pueden distinguir la separación clara de las variedades de canguil (Canguil blanco proveniente de Cotopaxi) y algunas accesiones del austro, puesto que estos materiales provienen de zonas cercanas y no se han visto afectados significativamente por el flujo génico.

Los resultados obtenidos reflejan que existe variabilidad genética entre los genotipos estudiados. Como menciona Peñaranda & Navas (2005), la estimación de diversidad genética es importante en el proceso de mejoramiento vegetal. Lo cual destaca que la presente investigación sea de base para estudios posteriores con la posibilidad de encontrar características interesantes que sean útiles para la formación de nuevas variedades en el Programa de Maíz del INIAP.

4.3. Análisis de variabilidad genética por razas y mezclas de maíz

En el análisis de diversidad genética de las razas de canguil y tusilla se realizó los estadísticos F, el análisis molecular de varianza y la distancia genética de Nei.

En cuanto a los resultados del AMOVA indican que existe diferenciación genética, con un porcentaje del 7% entre variedades. Sin embargo, esta diferencia es mínima debido a que los materiales comparten similar información genética. Del total de la variación los mayores porcentajes (61%) correspondieron a la variación dentro de cada individuo (Sánchez, 2011).

En cuanto a los estadísticos F como menciona Eguiarte *et al.*, (2010), es la correlación entre genes homólogos tomados de un nivel de la subdivisión, en relación con cualquier otro nivel superior. En el caso del índice de estimación de endogamia F_{is} , permite describir la distribución de los genotipos dentro de una población. El resultado obtenido en este estudio fue de 0.005, siendo un valor cercano a 0 y nos indica que las frecuencias de genotipos en la población se obtendrían si los apareamientos fueran estrictamente al azar. Además, Eguiarte *et al.*, (2010) indica que el principal determinante de la endogamia en las poblaciones vegetales es la probabilidad de que una semilla sea el resultado de polinización cruzada; y al presentar un valor positivo señala un nivel de endogamia, pero como el valor es cercano a 0, se considera como baja en estas dos razas. De los 9 loci analizados, 4 de ellos presentaron valores negativos (ϕ_{i072} : -0.235, ϕ_{i031} : -0.280, ϕ_{i015} : -0.028, ϕ_{i053} : -0.131); lo que nos indica que en estos casos existe un exceso de heterocigotos, probablemente porque los individuos heterocigotos poseen mejores características y sobreviven mejor que los homocigotos (selección natural).

El índice de fijación o F_{st} permite medir la reducción en la heterocigosis, debido a la diferenciación genética entre poblaciones (Eguiarte *et al.*, 2010). El valor obtenido en este estudio fue de 0.29, siendo un valor cercano a 0 y nos indica que las frecuencias alélicas son iguales en todas las poblaciones; es decir que aún no ha habido diferenciación significativa. De los 9 loci analizados el valor más alto registrado fue por parte del locus phi083, con un valor 0.480. Esto indica que existe una alta fijación de cierto alelo para este locus, ya que mientras más se acerca a 1 más fijación de un alelo existe.

El locus con el menor valor de FIT es el phi03, siendo este 0.064; y el locus con menor valor de FIS es el phi034, siendo este 0.027. El mayor porcentaje de variación genética corresponde a los loci phi083, phi050, phi059.

El flujo genético obtenido en promedio fue de 0.660, siendo un valor menor a 1, se puede decir que la deriva génica actúa independientemente en cada una de las poblaciones Canguil y Tusilla (Eguiarte *et al.*, 2010).

En el estudio de Garrido (2010) realizado por variedades con 13 loci estudiados, mostró un resultado positivo de Fis que indica un déficit de heterocigotos, con una media de 0.474; mientras que para dos locus fue negativo. Estos resultados indican un cierto grado de consanguinidad, que podría explicarse por el hecho de que los genotipos están relacionados genéticamente.

En la distancia de Nei entre las razas canguil (13 accesiones) y tusilla (21 accesiones), se observó que existe poca diferenciación genética entre

accesiones de cada raza, con valores cercanos a 0, debido al parentesco genético. En cuanto a la diferenciación entre razas, se observó que existía diferenciación genética debido a que los valores de distancia fueron cercanos a 1. La mayor similitud observada en la matriz de distancia fue entre las variedades tusilla de Manabí con tusilla de Napo, las cuales tuvieron una distancia de 0.998. Mientras que, la mayor diferencia es entre las variedades tusilla de Orellana con tusilla de Sucumbíos, con una distancia de Nei de 0.099.

En el análisis de la diversidad de las mezclas de maíz se consideró el análisis molecular de varianza, los estadísticos F y la distancia genética de Nei. En cuanto a los resultados del AMOVA indican que existe diferenciación genética, con un porcentaje del 4% entre variedades. Sin embargo, esta diferencia es mínima debido a que los materiales comparten similar información genética por la cercanía geográfica que poseen (Azuay y Cañar). Del total de la variación genética, los mayores porcentajes (66%) correspondieron a la variación dentro de cada individuo. Por lo cual los niveles de variación indican una diferenciación genética entre las variedades (Sánchez, 2011).

En los estadísticos F, el valor obtenido en el coeficiente de endogamia F_{is} fue de 0.018, siendo mayor al registrado en las variedades de Canguil y Tusilla debido al aumento en el número de variedades. El valor obtenido es cercano a 0 y nos indica que las frecuencias de genotipos en la población se obtendrían si los apareamientos fueran realizados estrictamente al azar (Eguiarte, *et al.*, 2010). De los 9 loci analizados, presentaron valores negativos 4 de ellos (ϕ_{i072} : -0.305,

phi031: -0.187, phi033: -0.228, phi053: -0.137), lo que nos indica que en estos casos existe un exceso de heterocigotos.

En este estudio se obtuvo que los loci: phi072, phi031, phi033, phi053, phi015 poseen un mayor número de homocigotos. El valor obtenido por el índice de fijación o F_{st} fue de 0.28 (siendo un valor cercano a 0) y nos indica que aún no ha habido diferenciación genética significativa (Eguiarte *et al.*, 2010). De los 9 loci analizados, el valor más alto registrado fue por parte del locus phi050, con un valor 0.568 (indicando que existe una alta fijación de cierto alelo para este locus).

El locus con el menor valor de FIT es el phi071, siendo este de -0.015; y el phi015 con un FIS de 0.054. El mayor porcentaje de variación genética corresponde al locus phi050, con un valor de 0.773.

El flujo genético obtenido en promedio fue de 0.756; este es un valor menor a 1, entonces se puede decir que la deriva génica actúa independientemente en cada una de las variedades (Eguiarte *et al.*, 2010).

En la distancia de Nei entre las mezclas de maíz (51 accesiones), se observó que existe diferenciación genética moderada entre accesiones, debido a que poseen una situación geográfica similar. La mayor similitud se observó para las variedades Sal prieta y Rojo Pajiro, con una distancia de 0.977. Mientras que, la mayor diferencia se observó entre las variedades Rojo Pajiro y Abuelito, con una distancia de Nei de 0.043.

4.4. Estimaciones y medidas de confianza por re-muestreo

Como menciona Balzarin & Di Rienzo (2004), una muestra bootstrap es obtenida por un muestreo aleatorio con reposición desde la muestra original. El error estándar y los intervalos de confianza fueron obtenidos mediante bootstrap entre cada loci; con un error estándar del 95% de significancia y con un número de 250 ciclos, respectivamente.

En los resultados obtenidos, se observó que el mayor porcentaje para la población Canguil en la estimación por Bootstrap fue de 75.6%, con un error estándar del 0.034 en el locus phi053; en la población Tusilla la estimación fue de 74.1%, con un error estándar del 0.025 en el locus phi059; en la población de mezclas de maíz fue de 79.3%, con un error estándar del 0.012 en el locus phi059. Estos valores indican que el primer phi059 fue el más polimórfico analizado en las poblaciones (dato que concuerda con el índice de información polimórfica 0.74).

Mientras que, en los resultados de menor valor para la población Canguil en la estimación por Bootstrap fue de 54.9%, con un error estándar del 0.065 en el locus phi050; en la población Tusilla la estimación fue de 34.9%, con un error estándar del 0.067 en el locus phi050. Finalmente, para la población de mezclas de maíz presento un porcentaje de 30.8%, con un error estándar del 0.046 con el locus phi050. Lo que indica que el primer phi050 fue el menos polimórfico

analizado en las poblaciones (dato que concuerda con el índice de información polimórfica 0.24).

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

- Los marcadores moleculares SSR (simple sequence repeat) utilizados en el estudio, permitieron detectar los polimorfismos en las variedades de maíz de una forma fácil por medio de la técnica PCR y con una alta reproducibilidad. Debido a su codominancia y al alto grado de polimorfismo, estos microsatélites son apropiados para analizar la diversidad genética de maíz; con los cuales se pudo identificar la diversidad y la estructura genética del Banco de Trabajo del Programa de Maíz del INIAP.

- La caracterización molecular de las razas canguil, tusilla y mezcla de maíz mediante la utilización de nueve marcadores microsatélites, reveló una riqueza alélica de 72 alelos, con un promedio de 8 alelos/locus.

- La heterocigosidad esperada 0.63, indican que los microsatélites seleccionados forman un conjunto de gran utilidad informativa para la caracterización de germoplasma de maíz. El PIC de 0.58 demostró un gran polimorfismo y diversidad genética en el germoplasma analizado. Los locus con mayor polimorfismo de acuerdo a los datos de: riqueza alélica, heterocigosis esperada, heterocigosis observada, PIC, valores F, son phi059, phi053, phi072, phi031 y phi083.

- Con el uso de los 9 marcadores microsatélites no se puede establecer grupos en base a su origen racial, debido a que es un número de primers relativamente pequeño para medir la variabilidad de 258 muestras de maíz.

- En el análisis de agrupamiento UPGMA se detectó la relación entre las variedades de canguil y el agrupamiento de las mezclas de maíz.

- Los análisis multivariados PCO confirman la falta de estructura genética en la población de maíz en estudio; sin embargo, las variedades de canguil blanco proveniente de Cotopaxi y algunas accesiones de las mezclas de maíz se encuentran agrupadas de forma clara.

- En el análisis de diversidad genética por razas de canguil y tusilla, el AMOVA dio un 7% de variabilidad genética. En los estadísticos F se observó un valor de diferenciación genética de 1.8% entre las variedades. La mayor similitud en la distancia genética fue observada en las variedades tusilla de Manabí con tusilla de Napo.

- En el análisis de diversidad genética para las mezclas de maíz el AMOVA dio un 4% de variabilidad genética. En los estadísticos F se observó un valor de diferenciación genética de 0.5% entre las razas. La mayor similitud en la distancia genética fue para las variedades Sal prieta y Rojo Pajiro.

- Con el análisis Bootstrap se obtuvo que el locus phi053 es el más polimórfico en las poblaciones; mientras que, el locus con menor polimorfismo es el locus phi050.

- La colección del Banco de Trabajo del Programa de Maíz posee diversidad genética, la mayor parte ocurre dentro de las poblaciones más que entre las razas.

CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

Se recomienda el uso un mayor número de marcadores moleculares SSRs para posteriores estudios de variabilidad genética en maíz.

Debido a la información existente sobre el genoma del maíz se podrían escoger primers que se encuentren ligados a genes de interés para obtener variedades mejoradas con características agronómicas deseadas.

Se debería realizar un análisis georeferenciado para identificar si existe relación del flujo génico de acuerdo a la ubicación geográfica de los materiales de maíz colectados.

Para estudios de estructura genética más precisos de *Zea mays* se recomienda usar técnicas moleculares con el ADN de cloroplasto para determinar el origen y la relación entre variedades.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- Acquaah, G. (2007). Principles of Plant Genetics and Breeding. *Oxford: Blackwell Publishing*. 12:487-496.
- Altieri, M. (2012). *Maíz y biodiversidad: efectos del maíz transgénico*. Recuperado el 8 de Enero de 2013, de <http://agroeco.org/wp-content/uploads/2010/10/alt.contam-maiz.pdf>
- Aranguren, J., Roman, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. (2005). Los microsatélites (STR's) marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación . *Archivos Latinoamericanos de Produccion Nacional*, 13: 30-42.
- Azofeifa, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*. 15:221-241.
- Balzarín, M., & Di Rienzo, J. (2004). Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. *Facultad de Ciencia Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina*. 7:1-228.
- Basantes, M. (2012). Caracterización molecular de la Colección Nacional de camote (*Ipomoea* spp.) del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP mediante marcadores moleculares microsatelite. Tesis Ing. Biotecnólogo. Ecuador, Sangolquí: Escuela Politecnica del Ejército .
- Bedoya, C. (2012). *ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES DE MAÍZ (Zea mays L.) EVALUADAS CON MICROSATÉLITES*. Missisipi: Universitat de les Illes Balears .
- Biociencias, L.-C. (2 de Septiembre de 2010). *LI-COR Biociencias*. Obtenido de <http://www.licor.com/bio/genomics/4300/documents/4300Brochure.pdf>
- Bonamico, N., Aiassa, J., Ibañez, M., Di Renzo, M., Díaz, D., & Salerno, J. (2004). Caracterización y clasificación de híbridos simples de maíz con marcadores SSR. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 11:129-144.

- Bracco, M., Lia, V., Poggio, L., Hernández, J., & Gottlieb, A. (2013). Caracterización genética de razas de maíz autóctonas de Misiones, Argentina. *SCIELO*.
- Bravo, A. (2009). Caracterización morfológica y molecular de accesiones de maíz negro (*Zea mays* L.) mediante Análisis de Secuencias Simples Repetidas. *Universidad San Francisco de Quito* .
- Brush, S. (1986). Genetic Diversity and conservation in traditional farming systems. *Entnobiology*. 6:151-167.
- Cárcamo, M. (7 de Enero de 2009). *Productores luchan por conservar el maíz criollo, amenazado de muerte por los transgénicos* . Obtenido de RAP-ALUruguay:http://webs.chasque.net/~rapaluy1/transgenicos/Uruguay/maiz_criollo.html
- Cerda, D. (28 de Agosto de 2011). *Tropical Tree Improvement & Conservation in Nicaragua*. Obtenido de <http://cerdagrd.blogspot.com/2011/06/diversidad-genetica-definicion.html>
- CIMMYT/IBPGR. (1991). *Descriptor for Maize*. México : International Maize and Wheat Improvement Center.
- De Wet, J., & Harlan, J. (1975). Weeds and domesticates evolution in a man-made habitat. *Econ. Bot.* 29:94-107.
- Del Villar, J., & Reynoso, G. (2010). *Caracterización molecular mediante la técnica de microsatélites de dos materiales genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill.) cultivados en la República Dominicana*. República Dominicana: Universidad ISA.
- Dintzis, F., Bagley, E., & Felker, F. (1995). Shear thickening and flow-induced structure in a system of DMSO containing waxy maize starch. *Rheology*, 39: 1399-1409.
- Eguiarte, L., Aguirre, E., Scheinvar, E., González, A., & Souza, V. (2010). Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Escobar, D. (2006). Plantas y semillas, nuevos recursos de protección legal agraria para los tejidos y comunidades de México (el caso del maíz). *Estudios Agrarios*. 34: 9-52.

- Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR . En L. Eguiarte, & V. Souza, *Introducción a la Ecología Molecular* (pág. 592). México : Instituto Nacional de Ecología .
- FAO. (2013). *Conservación de recursos genéticos*. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/006/ad111s/AD111S05.htm>
- Ferreira, M., & Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético . *EMBRAPA*.
- Flores, S., Olivares, J., & Flores, L. (2005). ESTUDIO CITOGÉNÉTICO DEL MAÍZ HÍBRIDO SIMPLE H-311 (ZEA MAYS SSP.MAYS), TEOCINTLE CHALQUEÑO (ZEA MAYS SSP. MEXICANA) Y SU HÍBRIDO F1 (ZEA MAYS SSP . MAYS X ZEA MAYS SSP. MEXICANA). 25:47-72.
- Galindo, M., & Milagro, P. (2011). GENETIC RELATIONSHIPS WITHIN AVOCADO (*Persea americana* Mill.) IN SEVEN MUNICIPALITIES OF CENTRAL VERACRUZ, CHARACTERIZED USING MICROSATELLITE MARKERS. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*.
- Garrido, A. (2010). Caracterización molecular de la colección germoplasma del INIAP mediante marcadores moleculares microsatélites. Quito, Ecuador, Escuela Politécnica del Ejército.
- González, L., Hernández, A., & Alezones, J. (2009). Caracterización molecular de líneas tropicales de maíz (*Zea mays* L.) y su relación con los patrones heteróticos. *Bioagro*. 21: 165-172.
- González, L., Hernández, A., & Alezones, J. (2009). Caracterización molecular de líneas tropicales de maíz (*Zea mays* L.) y su relación con los patrones heteróticos. *Bioagro*. 32:165-172.
- Grobman, A., Salhauana, W., & Sevilla, R. (1961). *Races of maize in Peru: their origins, evolution and classification*. Washington, DC: Publication 915.
- Hedrick, P. (1999). Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation . *Evolution* . 23:313-318.
- INEC. (24 de Julio de 2012). *Visualizador de estadísticas agropecuarias del Ecuador ESPAC*. Obtenido de Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, EC:
http://www.inec.gob.ec/estadisticas/?option=com_content&view=article&id=103&Itemid=75.

- Jacho, L. (2009). Caracterización molecular y análisis químico nutritivo de 27 accesiones de maíz chulpi (*Zea mays* L.) y 65 accesiones de maíz negro colectadas en la serranía del Ecuador INIAP. *Universidad Central del Ecuador*.
- Jones, E. (2007). A comparison of simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism marker technologies for the genotypic analysis of maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl, 115*(Genet). 12:361-371.
- LI-COR Biosciences. (12 de 05 de 2012). *Biotechnology, Advanced Discovery with*. Obtenido de www.licor.com/bio/applications/applications.jsp
- Liu, K., & Muse, S. (Consultado 10 de abr. 2013 de 2005). *Power Maker: Integrated analysis environment for genetics marker*. . Obtenido de <http://statgen.ncsu.edu/powermarker/>.
- Mera, L., & Mapes, C. (2009). Origen y diversificación del maíz. En C. Galindo (Ed.), *El maíz. Aspectos biológicos* (págs. 17-19). México: Impresora Apolo.
- Moctezuma, E., & Günter, K. (2000). Huellas de ADN en genomas de Plantas (Teoría y protocolos de Laboratorio). En W. Kowalski, *Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook - UVGI for Air Surface Desinfection* (págs. 7-21 99-111.). México DF.
- Morales, K. (2003). EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR POR MICROSATÉLITES DE GENOTIPOS DE MAÍZ (*Zea mays* L.) DE ALTURA, INIAP. Quito, Ecuador: Universidad Central del Ecuador.
- Morejón, M. (2010). Estrategia de mercado para la comercialización de maíz duro en el cantón Ventanas provincia de Los Ríos. . *Universidad Estatal de Bolívar*, 89.
- Morillo, E., & Miño, G. (2011). *Manual Protocolos de Marcadores Moleculares*. Quito, Ecuador : INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Departamento Nacional de Bio.
- Mostacero, L., Mejía, C., & Gamarra, T. (2002). *Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú*. Trujillo : Normas Legales .
- Nei, M. (1987). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89:583-590.

- Nguyen, H., Nguyen, H., Nguyen, V., & Bui, M. (2012). THE APPLICATION OF SSR MOLECULAR INDICATOR TO ASSESS THE PURITY AND GENETIC DIVERSITY OF WAXY CORN INBRED LINES. *J. ISSAAS*, 2:45-54.
- Paliwal, R., Granados, G., Lafitte, H., & Violic, A. (2001). *El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción*. Roma. Italia : Dirección de Producción y Protección Vegetal de la FAO.
- Peakall, R., & Smouse, P. (2012). GenAIEx 6.5: genetics analysis in Excel. Population genetic software for teaching an research-an update. *Bioinformatics*. 28: 2537-2539. .
- Pejic, I., Ajmone-Marsan, P., Morgante, M., Kozumplick, V., Castiglioni, P., Taramino, G., & Motto, M. (1998). Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theoretical and Applied genetics*. 97:1248-1255.
- Pennaranda, M., & Navas, A. (2005). Caracterización molecular y evaluación bioquímica de cultivares colombianos y germoplasma elite de maíz según contenido de aceite . *Agronomía Colombiana*. 12:7-16.
- Peñaranda, M., & Navas, A. (2005). Caracterización molecular y evaluación bioquímica de cultivares colombianos y germoplasma elite de maíz según contenido de aceite. *FITOMEJORAMIENTO, RECURSOS GENÉTICOS Y BIOLOGÍA MOLECULAR*. 23: 7-16.
- Pérez de Castro, A. (2010). *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Person, M. (1990). *Manuales para educación Agropecuaria. Producción Vegetal N.-10*. México, DF: Trillas.
- Piñeiro, D. (2008). *La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México*. México : CONABIO.
- Rocha, P. (2002). Teoría y práctica para la extracción y purificación del DNA de palma de aceite. *PALMAS*. 23:9-17.
- Rolph, F. (1994). *NTSYS pc: numerical taxonomy and multivariate system, version 2.0*. Setauket New York, USA.: Exeter Software.
- Abadie, Berretta. 2001. Caracterización y evaluación de recursos fitogenéticos en: "Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur".

encontrado en Ruiz, E. (2011). 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. . Tesis Ing Agropecuaria. Santo Domingo IASA II.

Sanchez, J. (2011). Diversidad del Maíz y el Teocintle. *Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Manuscrito.

Sánchez, J. (2011). DIVERSIDAD DEL MAIZ Y TEOCINTLE . *Informe preparado para el proyecto: "Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México"*.

Senior, M. (1998). Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. *Crop Sci* , 38:1088-1098.

Silva, M. (2011). Variabilidad patogénica, diversidad genética, y estructura poblacional *Cochliobolus sativus*, agente causal de la mancha borrosa de la cebada. Motevideo.

Timothy, D., Hatheway, W., Grant, U., Torregroza, M., Sarria, D., & Varela, D. (1966). *Razas de maíz en Ecuador*. Bogotá, Colombia: Instituto Colombiano Agropecuario. 92 p. (Boletín técnico N°12).

Weising, K., Nybom, K., & Meyer, W. (1995). DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. *CRC Press*. 12:24-37.

Yáñez, C. (2002). *Manual de producción de maíz para pequeños agricultores y agricultoras*. Quito: FAO/INAMHI/MAG. p. 1-16.

Young, A., Boyle, T., & Brow, T. (1996). The population genetics consequence of habitat fragmentation for plants . *TREE*. 46:413-418.

Zerené, M. (2010). *Identificación de marcadores moleculares tipo microsatélites asociados a loci genéticos para calidad panadera en trigos de pan*. Recuperado el 28 de Febrero de 2013, de http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/title/identificacion-marcadores-moleculares-tipo-microsatelites-asociados-loci-geneticos-calidad-panadera/id/20986.html