

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

Silva, M. Yáñez, C<sup>1</sup>. Morillo, E<sup>2</sup>. Proaño, K<sup>3</sup>. Taípe, M<sup>4</sup>.

---

<sup>1</sup> Programa de Maíz (Estación Experimental Santa Catalina) - Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP)

<sup>2</sup> Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) – Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP)

<sup>3</sup> Laboratorio de Biotecnología Vegetal - Universidad de las fuerzas Armadas – ESPE

<sup>4</sup> Docente de la Carrera de Biotecnología – Universidad de las fuerzas Armadas – ESPE

## RESUMEN

El maíz (*Zea mays* L.) debido a su 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 4300s. 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.

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

## INTRODUCCIÓN

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).

## MATERIALES Y MÉTODOS

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.

La caracterización molecular se realizó en el laboratorio de biología molecular del Departamento Nacional de Biotecnología en la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.

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 µl del tampón de extracción en un tubo eppendorf, y se colocó 700 µl del tampón. Se incubó las muestras a 65°C por 1 hora y se agitó cada 30 minutos. Se centrifugó a 14000 rev por 15 minutos. Se tomó el sobrenadante y se añadió 600 µl 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 µl de etanol frío al 100%, se mezcló suavemente y se dejó reposar en el congelador a -20°C por 2 horas. Después se centrifugó y se retiró el etanol, se lavó dos veces el pellet con 1 ml de etanol al 75%. Una vez evaporado el etanol se resuspendió el pellet en 100µl 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.

Para la validación se empleó los primers con marcadores moleculares tipo SSR, con los primer phi116 y phi121 de maíz disponibles en el Departamento Nacional de Biotecnología (Senior, 1998), con el coctel de reacción de PCR detallado en la tabla 1.1, utilizando el programa de la tabla 1.2 en el termociclador PTC-100.

**Tabla 1.1:** Coctel de amplificación de PCR de microsatélites empleado para el proceso de validación (Morillo & Miño, 2011)

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
<i>DNA (5 ng/µl)</i>	2,00 µl
<i>MgCl<sub>2</sub> (25 mM)</i>	0,50 µl
<i>Buffer Gotaq (5X)</i>	1,00 µl
<i>dNTP's (5 mM)</i>	0,20 µl
<i>M13 -700/800 (1 µM)</i>	0,80 µl
<i>Primers F-M13 (1 µM)</i>	0,05 µl
<i>Primer R (10 µM)</i>	0,08 µl
<i>Taq polimerasa 5 U/µl</i>	0,05 µl
<i>Agua ultrapura</i>	0,32 µl
<i>Volumen final</i>	<b>5,00 µl</b>

**Tabla 1.2:** Programa de amplificación utilizado en el termociclador (Morillo & Miño, 2011).

	Temperatura °C	Tiempo		Temperatura °C	Tiempo	
<i>Ciclo inicial de denaturación</i>	94	5 min	<b>30 ciclos</b>	<i>Ciclo inicial de denaturación</i>	94	2 min
<i>Denaturación cíclica</i>	94	45 seg		<i>Denaturación</i>	95	4 min
<i>Anillamiento</i>	De acuerdo al primer	1 min		<i>Denaturación cíclica</i>	95	1 min
<i>Elongación cíclica</i>	72	2 min		<i>Anillamiento</i>	50-68	2 min
<i>Ciclo final de elongación</i>	72	7 min		<i>Elongación cíclica</i>	72	2 min
<i>Estabilización</i>	10	5 min		<i>Ciclo final de elongación</i>	72	10 min
				<i>Estabilización</i>	4	min

Para la amplificación de todas las muestras con los 9 primer por el método M13-tailing los cuales fueron reportados por Morales (2003) y Nguyen et al., (2012), se utilizó el coctel de reacción para PCR que se detalla en la tabla 1.3, utilizando el programa de la tabla 1.4 en el termociclador PTC-100.

**Tabla 1.3:** Coctel para amplificación de microsatélites M-13 tailing (Morillo & Miño, 2011)

Reactivo	Volumen
<i>DNA (5 ng/μl)</i>	2,00 μl
<i>MgCl<sub>2</sub> (25 mM)</i>	0,60 μl
<i>Buffer Gotaq (5X)</i>	1,50 μl
<i>dNTP`s (5 mM)</i>	0,38 μl
<i>Primers F (10 μM)</i>	0,375 μl
<i>Primer R (10 μM)</i>	0,375 μl
<i>Taq polimerasa 5 U/μl</i>	0,10 μl
<i>Agua ultrapura</i>	2,17 μl
<b>Total</b>	<b>7,5 μl</b>

**Tabla 1.4:** Programa de amplificación utilizado en el termociclador (Morillo & Miño, 2011).

Para el genotipaje primero se creó un proyecto en el software SAGA-GT Microsatellite llamado MAIZ, en este se detalló la información de cada primer como la talla, el canal en el que amplifican (700-800 nm), el rango del tamaño de bandas, los dúplex y triplex formados y se ubicó de antemano la posición que tuvo cada pocillo del gel con la muestra de maíz.

El gel de acrilamida compuesto de 20 ml de KB Gel Matriz Plus 6.5%, 150 μl de APS (Persulfato de amonio) al 10 % y 15 μl de Temmed (Tetramethylethylene- dianime al 99%) se colocó entre las placas de vidrio del LI-COR 4300 y se ubicó el peine, después de 1 hora de polimerización del gel se colocó en el LI-COR 4300 con el buffer TBE 1X (Tris-Borate-EDTA) KB Plus LI-COR. Antes de empezar a cargar se realizó una pre-corrida de 25 min a 1500 V para enfocar el focus del láser a 700 y 800 nm. Por último se cargó 0.8 μl de los productos amplificados los cuales fueron previamente diluidos con Blue Stop Solution LI-COR en una relación 1:1 y denaturados a 94 °C por 5 min, se inició la corrida a 1500 V por 1 hora y media. El marcador de peso molecular que se utilizó fue el IRDye 30-350 bp.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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 González, 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 heterocigosidad 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).

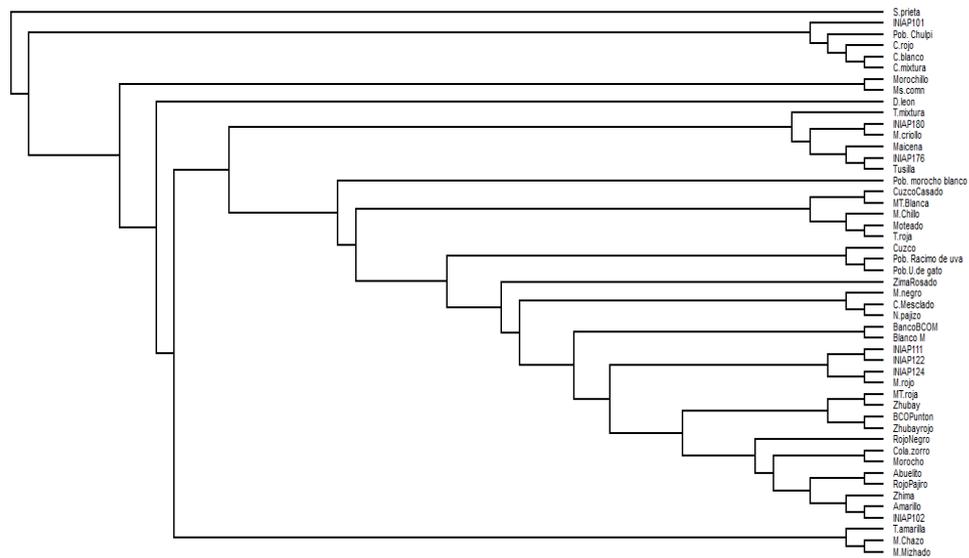
El valor del índice de polimorfismo contenido (PIC) osciló en un rango de 0.2443 y 0.7421, con un promedio de 0.58 para los 9 marcadores microsatélites utilizados. El promedio de la medida de PIC obtenido en este estudio fue similar al reportado por (Bravo, 2009), en el cual su rango varía entre 0.30 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 tengan 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).

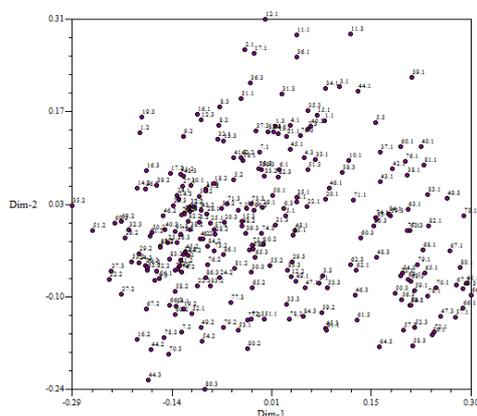
En el caso de las mezclas de maíz provenientes de colectas del austro y del Banco de Trabajo del Programa de Maíz, se observó la conformación de dos grupos; en los cuales, debido al flujo genético existe gran diversidad de genotipos en los individuos de investigación. Además, como menciona Bracco et 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.



**Figura 1.1:** El dendrograma formado a partir de la matriz de distancia de Shared Allele Distance de las diferentes variedades de maíz obtenido del software PowerMarker.

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.



**Figura 1.1:** Análisis de coordenadas principales (PCO) de 258 muestras de maíz analizadas con 9 primers SSRs, con dos coordenadas.

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 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 Fis, 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 ( $\phi_{072}$ : -0.235,  $\phi_{031}$ : -0.280,  $\phi_{015}$ : -0.028,  $\phi_{053}$ : -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  $\phi_{083}$ , 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  $\phi_{03}$ , siendo este 0.064; y el locus con menor valor de FIS es el  $\phi_{034}$ , siendo este 0.027. El mayor porcentaje de variación genética corresponde a los loci  $\phi_{083}$ ,  $\phi_{050}$ ,  $\phi_{059}$ .

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 Fis 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 ( $\phi_{072}$ : -0.305,  $\phi_{031}$ : -0.187,  $\phi_{033}$ : -0.228,  $\phi_{053}$ : -0.137), lo que nos indica que en estos casos existe un exceso de heterocigotos.

En este estudio se obtuvo que los loci:  $\phi_{072}$ ,  $\phi_{031}$ ,  $\phi_{033}$ ,  $\phi_{053}$ ,  $\phi_{015}$  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  $\phi_{050}$ , 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  $\phi_{071}$ , siendo este de -0.015; y el  $\phi_{015}$  con un FIS de 0.054. El mayor porcentaje de variación genética corresponde al locus  $\phi_{050}$ , 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,

## 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

la mayor diferencia se observó entre las variedades Rojo Pajiro y Abuelito, con una distancia de Nei de 0.043.

Como menciona Balzarín & 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 3.4% en el locus  $\phi_{053}$ ; en la población Tusilla la estimación fue de 74.1%, con un error estándar del 2.5% en el locus  $\phi_{059}$ ; en la población de mezclas de maíz fue de 79.3%, con un error estándar del 1.2% en el locus  $\phi_{059}$ . Estos valores indican que el primer  $\phi_{059}$  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 6.5% en el locus  $\phi_{050}$ ; en la población Tusilla la estimación fue de 34.9%, con un error estándar del 6.7% en el locus  $\phi_{050}$ . Finalmente, para la población de mezclas de maíz presento un porcentaje de 30.8%, con un error estándar del 4.6% con el locus  $\phi_{050}$ . Lo que indica que el primer  $\phi_{050}$  fue el menos polimórfico analizado en las poblaciones (dato que concuerda con el índice de información polimórfica 0.24).

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, heterocigosidad esperada, heterocigosidad 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.

## 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 Producción 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 microsatélite. Tesis Ing. Biotecnólogo. Ecuador, Sangolquí: Escuela Politécnica 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. *Entomology*. 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](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 CITOGÉNICO 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 Ejercito.

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](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](http://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 fanerogamas 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). GenAlEx 6.5: genetics analysis in Excel. Population genetic software for teaching and 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 Fingerpriting 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](http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/title/identificacion-marcadores-moleculares-tipo-microsatelites-asociados-loci-geneticos-calidad-panadera/id/20986.html)