



“Por un Desarrollo
Agrario
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
MAESTRÍA INTERINSTITUCIONAL EN
BIOTECNOLOGIA

Trabajo de Tesis

**Caracterización molecular de ocho líneas
endogámicas de maíz (*Zea mays* L.), a través
de marcadores microsatélites SSR**

Autor

Ing. Ángela María Pineda Somarriba

Asesor

MSc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga

Managua, Nicaragua

Junio, 2021



“Por un Desarrollo
Agrario
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
MAESTRÍA INTERINSTITUCIONAL EN
BIOTECNOLOGIA

Trabajo de Tesis

**Caracterización molecular de ocho líneas
endogámicas de maíz (*Zea mays* L.), a través
de marcadores microsatélites SSR**

Autor

Ing. Ángela María Pineda Somarriba

Asesor

MSc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga

Presentado a la consideración del honorable tribunal
examinador como requisito final para optar al grado
de Maestro en Ciencias

Managua, Nicaragua
Junio, 2021



Hoja de aprobación del Tribunal Examinador

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable Tribunal Examinador designado por el Decanato de la Facultad de Agronomía como requisito final para optar al título profesional de:

Maestro en Ciencias en Biotecnología

Miembros del Tribunal Examinador

Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz
Presidente (Grado académico y
nombre)

Dra. Marlene Muñoz
Secretario (Grado académico y
nombre)

Dr. Víctor Manuel Aguilar Bustamante
Vocal (Grado académico y nombre)

Lugar y Fecha: Managua. 17 Junio 2021

DEDICATORIA

Hoy quiero expresar mi gratitud al altísimo señor Jesucristo y a la virgen de Guadalupe que me han dado la vida, y muchas bendiciones maravillosas, cada día me dan un hermoso amanecer y una oportunidad más para hacer realidad todos mis sueños al lado de las personas que más amo. Prometo dar todo lo mejor de mí y construir junto a mi familia un mejor mañana.

A mi madre **Ana Evelyn Somarriba**, por ser la madre más valiente, luchadora, decidida e invencible antes las dificultades que se le presentan, gracias por hacerme crecer, por defenderme, por enseñarme las cosas buenas y malas que hay en el mundo, por su incondicional apoyo para que siguiera preparándome y por su amor infinito, eres uno de mis más grandes orgullos.

A mi padre: **Aníbal Pineda**, quien fue una persona ejemplar, aunque físicamente él no está conmigo, pero en mi mente y mi corazón siempre está presente y los consejos que me daba de ser una persona con actitudes positivas y de alcanzar las metas que me propusiera los seguiré cumpliendo en memoria de mi padre te recordaré, te amare y vivirás por siempre en mi corazón.

A mi abuelita **Gregoria Rugama Luna**, quien me enseñó a ser una persona con buenos principios, por su amor incondicional, hizo un grandioso trabajo como madre.

A mis hijos **Mario Alberto Castillo** y **Maryan Guadalupe Cerrato**, que día a día me dan las fuerzas, aliento, son mis anclas de seguir luchando y para ser un ejemplo en el futuro de ellos.

A mi esposo **Norlan Cerrato** por sus consejos de que siga con mis estudios para fortalecer mis conocimientos.

Mis hermanas **Arlen Pineda** y **Evelyn Pineda**, por su apoyo de estar ahí cuando las necesito, de ser tan especial con mis hijos.

AGRADECIMIENTO

A Dios padre, por esta gran bendición de seguir formándome en mi vida profesional.

A mi madre que siempre ha estado conmigo luchando en los momentos más duros y los momentos más felices de mi vida.

A mis hijos Mario Alberto Castillo y Maryan Guadalupe Cerrato quienes son mis columnas fundamentales y fuente de motivación e inspiración día tras día en este nuevo reto de mi vida.

A mi esposo Norlan Cerrato que siempre me ha apoyado en mis decisiones y sus consejos día a día que siga superándome en mi vida profesional.

Al Ing. MSc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga, quien fue mi asesor, siendo un eslabón clave para la culminación de mis tesis, no poniendo obstáculos cuando le solicité su apoyo como asesor.

A los Ing. MSc. Donald Juárez y Andrea Zamora Jarquín, por su apoyo de transmitir sus conocimientos en la etapa que se realizó en el laboratorio de biotecnología del INTA-CNIA.

Al INTA, por darme la oportunidad de seguir creciendo en mi formación profesional.

INDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
INDICE DE CONTENIDO	i
INDICE DE CUADROS	iii
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE ANEXOS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
III. MARCO DE REFERENCIA	4
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1 Ubicación del estudio	13
4.2 Material genético	13
4.2.1 Siembra y preparación de tejidos	16
4.2.2 Procedimiento extracción del ADN	17
4.2.3 Amplificación del ADN	17
4.2.4 Electroforesis y visualización de los productos de PCR	18
4.2.5 Análisis de la diversidad	19
4.2.6 Análisis de varianza molecular (AMOVA)	21
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
5.1 Diversidad genética por locus de las 8 líneas de maíz	22
5.1.1 Número de alelos	22
5.1.2 Heterocigosidad observada y esperada	23
5.1.3 Contenido de Información Polimórfica (CIP)	24
5.1.4 Diversidad Índice de Shannon	25
5.2 Diversidad genética por línea	26
5.2.1 Número de alelos	26
5.2.2 Heterocigosidad observada y esperada	27
5.2.3 Índice de Shannon	27

5.2.4 Frecuencia alélica de los marcadores	28
5.3 Frecuencias alélicas por marcador microsatélite	28
5.3.1 Frecuencia alélica de locus PHI 96100	28
5.3.2 Frecuencia alélica locus BNLG 1272	29
5.3.3 Frecuencia alélica locus PHI 112	29
5.3.4 Frecuencia alélica locus PHI 063	29
5.3.5 Frecuencia alélica locus P-UMC 1304	30
5.3.6 Frecuencia alélica locus BNLG 127	30
5.3.7 Frecuencia alélica locus BNLG 1176	31
5.3.8 Frecuencia alélica locus BNLG 197	31
5.3.9 Frecuencia alélica locus BNLG 609	31
5.3.10 Frecuencia alélica locus PHI 057	31
5.3.11 Frecuencia alélica locus BNLG 400	32
5.3.12 Frecuencia alélica locus UCM 1645	32
5.3.13 Frecuencia alélica locus UCM 1845	33
5.3.14 Frecuencia alélica locus PHI 026	33
5.3.15 Frecuencia alélica locus UCM 1792	33
5.3.16 Frecuencia alélica locus NC 13	34
5.3.17 Frecuencia alélica locus BNLG 1600	34
5.3.18 Frecuencia alélica locus UMC 1073	35
5.3.19 Frecuencia alélica locus BNLG 1169	35
5.3.20 Frecuencia alélica locus PHI 119	35
5.4 Análisis molecular de varianza (AMOVA)	36
5.4.1 Variación genética dentro y entre las poblaciones de maíz a través del análisis molecular de varianza (AMOVA)	36
5.5 Distancia genética	37
5.6 Análisis de conglomerado para características moleculares	38
VI. CONCLUSIONES	40
VII. RECOMENDACIONES	41
VIII. LITERATURA CITADA	42
IX. ANEXOS	50

INDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1.	Líneas CML y R ₁ de maíz blanco utilizadas para el estudio de caracterización con 20 cebadores en marcadores moleculares tipo SSR	13
2.	Características morfológicas y de calidad de 8 Líneas CML y la línea R ₁ de maíz blanco	14
3.	Características capacidad o aptitud combinatoria y de tolerancia al estrés y resistencia de 8 Líneas CML y la línea R ₁ de maíz blanco	15
4.	Secuencias de los 20 marcadores microsatélites SSR utilizados en la caracterización de 8 líneas de maíz	16
5.	Ocho líneas clasificadas en dos sub-poblaciones de acuerdo a la textura del grano del maíz	21
6.	Parámetros de diversidad genética en 20 marcadores microsatelitales, usados en la evaluación molecular de 8 líneas de maíz	26
7.	Parámetros de diversidad genética por líneas utilizando marcadores microsatélites	28
8.	Análisis molecular de varianza entre y dentro en 8 líneas de maíz	37
9.	Distancias genéticas entre pares de líneas de maíz, con valores de las distancias genéticas de acuerdo a Nei (1973)	38

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	Frecuencia alélica de los marcadores microsatélites PHI 96100, BNLG 1272, PHI 112, PHI 063 y P-UMC 1304 analizados en 8 líneas de maíz.	30
2.	Frecuencia alélica de los marcadores microsatélites, BNLG 127, BNLG 1176, BNLG 197, BNLG 609 y PHI 057 analizados en 8 líneas de maíz.	32
3.	Frecuencia alélica de los marcadores microsatélites, BNLG 400, UCM 1645, UCM 1845, PHI 026 y UCM 1792 analizados en 8 líneas de maíz.	34
4.	Frecuencia alélica de los marcadores microsatélites, N 13, BNLG 1600, UCM 1073, BNLG1169 y PHI 119 analizados en 8 líneas de maíz.	36
5.	Dendrograma obtenido mediante el algoritmo de UPGMA de los coeficientes de distancia de Jaccard con datos obtenidos con 20 marcadores moleculares SSR en 8 líneas de maíz de datos marcadores.	39

INDICE DE ANEXOS

ANEXO		PÁGINA
1.	Preparación de soluciones que se usaron en la extracción de ADN	50
2.	Protocolos amplificación de ADN, para correr muestras de maíz en PCR	51
3	Protocolos de 20 marcadores optimizados para PCR de las 8 líneas de maíz, 2018	52
4.	Procedimiento y dosis para preparar Gel de Agarosa metaphor PCR 1%	53
5.	Fotografías en la realización del estudio.	54

RESUMEN

En Nicaragua el cultivo de maíz es considerado uno de los cereales de mayor importancia, por su alto contenido de carbohidratos y demás elementos nutritivos, es por eso que se siembra extensivamente en todas las regiones del país para ser utilizado tanto para consumo humano como a nivel industrial. El propósito del presente estudio es contribuir al mejoramiento genético del cultivo de maíz, haciendo uso de 20 marcadores del tipo microsatélites para la caracterización molecular de 8 líneas endogámicas de maíz. El estudio se realizó en el Centro Nacional de Investigación Agropecuaria (CNIA) del Instituto Nicaragüense Tecnología agropecuario (INTA), perteneciente al Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA), ubicado en el Valle San Cristóbal, km 14.1 Carretera norte, 2.5 km al sur, Managua en el año 2019. Los datos moleculares se analizaron empleando los programas estadísticos InfoGen y Gen AlEx 6.5. El rango de número de alelos por locus varió entre 2 a 6, resultando que los loci con mayor polimorfismo fueron el BNLG 197 con 6 alelos seguido de PHI 026, BNLG 1600, UMC 1845 y el BNLG 1272 con 5 alelos. Las mayores frecuencias alélicas se registraron en las líneas CML 269, CML 247 y CML 596 y la que presentó menor frecuencia alélica fue CML 573. El mayor valor de PIC se obtuvo en las líneas BNLG 197, PHI 026 y BNLG 1600 con 0,754, 0,746 y 0,746 respectivamente. Los menores valores PIC lo presentaron BNLG 609 y PHI 057 con 0,375 y 0,468, respectivamente. Las líneas que presentaron mayor distancia genética fueron CML 247 y CML 269 con valor de 0.83 y la menor distancia genética se registró entre las líneas CML 247 con la R₁ con valor de 0.51. Las distancias genéticas de acuerdo al coeficiente de Jaccard conformaron un dendrograma de tres grupos partiendo de un valor fijo de 0.43.

Palabras clave: *Zea mays* L., líneas puras, endogamia, marcadores microsatélites.

ABSTRACT

In Nicaragua, the cultivation of maize is considered one of the most important cereals, due to its high content of carbohydrates and other nutritional elements, that is why it is widely planted in all regions of the country to be used both for human consumption and at the level industrial. The purpose of this study is to contribute to the genetic improvement of the maize crop, making use of 20 microsatellite markers for the molecular characterization of 8 inbred maize lines. The study was carried out at the National Center for Agricultural Research (CNIA) of INTA, belonging to the Nicaraguan Institute of Agricultural Technology (INTA), located in the San Cristóbal Valley, Km 14.1 North highway, 2.5 km south, Managua in the year 2019. The molecular data were analyzed using the statistical programs InfoGen and Gen ALEx 6.5. The range of number of alleles per locus ranged from 2 to 6, resulting in the loci with the highest polymorphism being BNLG 197 with 6 alleles followed by PHI 026, BNLG 1600, UMC 1845 and BNLG 1272 with 5 alleles. The highest allelic frequencies were recorded in the lines CML 269, CML 247 and CML 596 and the one with the lowest allelic frequency was CML 573. The highest PIC value was obtained in the lines BNLG 197, PHI 026 and BNLG 1600 with 0.754, 0.746 and 0.746 respectively. The lowest PIC values were presented by BNLG 609 and PHI 057 with 0.375 and 0.468, respectively. The lines that presented the greatest genetic distance were CML 247 and CML 269 with a value of 0.83 and the least genetic distance was recorded between the CML 247 lines with R1 with a value of 0.51. The genetic distances according to the Jaccard coefficient formed a dendrogram of three groups starting from a fixed value of 0.43.

Keywords: *Zea mays* L., pure lines, inbreeding, microsatellite markers.

I. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia en Nicaragua, siendo este cultivo un componente básico para la seguridad alimentaria, como parte de la dieta diaria, por su uso en diversos platos alimenticios y nutricionales de la población rural. Este rubro es cultivado principalmente por agricultores a pequeña escala en zonas favorables y desfavorables (IICA, 2007).

El maíz es el cultivo más generalizado en la mayoría de países de la región centroamericana, ocupando una superficie total de 2 133 547.14 hectáreas (IICA-Red SICTA, 2013). En Nicaragua el período 2019-2020, se cosecharon 301 725.20 hectáreas, con una producción de 440 mil toneladas, 1.2% superior a la producción del ciclo anterior y se exportaron 4 785 toneladas (Plan de producción ciclo 2020-2021).

Los rendimientos en Nicaragua son sumamente bajos 1 358.5 kg ha⁻¹, según MAGFOR (2012-2013), esto se debe a que del 100% del área total cultivada, el 66% se usa semilla de genotipos criollos y/o acriolladas, un 30% es cultivado con semilla de variedades mejoradas y el 4% con semilla híbridas.

De acuerdo con la FAO (2014), los bajos rendimientos en Nicaragua se deben al mal manejo del cultivo, a la irregularidad de las precipitaciones, al uso de grano como semilla, al uso de variedades de bajo potencial productivo (criollas), cultura y costumbre social y a las afectaciones por efecto del cambio climático que alteran la normalidad de factores bióticos y abióticos.

Cada vez es más apremiante la necesidad de obtener variedades de maíz a corto plazo, mejor adaptadas a las condiciones ambientales del sistema de temporal regular a bueno con una entrada mínima de insumos e incrementar el potencial productivo de los agro-ecosistemas. Actualmente el proceso de liberación de variedades mejoradas para condiciones de temporal es muy lento debido a la poca eficiencia de la selección por efecto del medio ambiente (Gutiérrez *et al.*, 2016).

A mediados de la década de los 60's los marcadores utilizados en estudios de genética y mejoramiento eran aquellos controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, en

general fenotipos de fácil identificación visual como enanismo, deficiencia clorofílica, color de pétalos o morfología foliar. Sin embargo, el pequeño número de marcadores morfológicos distintos en un mismo linaje reducía la probabilidad de encontrar asociaciones significativas entre estos marcadores y caracteres de importancia económica a través del estudio de poblaciones segregantes (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Se consideran marcadores morfológicos a los caracteres de un individuo que se expresan en un ambiente específico y que el hombre identifica con un objetivo determinado. Este tipo de marcadores son muy utilizados para estimar la variación morfológica existente en una población (Solís y Andrade, 2005).

El uso de marcadores de ADN apoya la selección de plantas, pues permite detectar lugares específicos de las secuencias de genes que difieren entre cultivares o líneas mejoradas (Suslow *et al.*, 2005). Las tecnologías basadas en el empleo de marcadores moleculares son de utilidad no sólo en la caracterización de genotipos, sino también en estudios de similitud o distancia genética, que permiten obtener una clasificación de los mismos en diferentes grupos (Bonamico *et al.*, 2004).

Los marcadores moleculares microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeats, por sus siglas en inglés) son secuencias de ADN en las que un fragmento, de tamaño entre uno y seis nucleótidos, se repite de manera consecutiva a lo largo de todo el genoma. De esta manera se pueden estimar las distancias genéticas entre poblaciones o entre individuos (Matsuoka *et al.*, 2002). Los marcadores moleculares utilizados en el presente estudio fueron los SSR ya que permiten la obtención de datos poblacionales y el cálculo de frecuencias alélicas.

En Nicaragua el empleo de marcadores moleculares en la agricultura lo realizan un reducido número de laboratorios ubicados en universidades y centros de investigación, que deben ser utilizados para potenciar las ventajas que los marcadores pueden proporcionar a especialistas como los mejoradores genéticos de plantas para facilitarles la selección de individuos dentro de las poblaciones con mayor efectividad y reducción significativa tanto en el tiempo de selección como en recursos económicos. En el presente estudio se persigue evaluar la divergencia genética existente entre 8 líneas promisorias de maíz haciendo uso de 20 marcadores de tipo microsatélite.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Caracterización molecular de ocho líneas endogámicas de maíz (*Zea mays* L.), mediante el empleo de marcadores moleculares de Secuencias Simples Repetitivas (SSR).

2.2 Objetivos específicos

- Identificar el polimorfismo de 20 marcadores SSR en ocho líneas endogámicas de maíz.
- Determinar la variabilidad genética presente entre las ocho líneas endogámicas de maíz con el empleo de 20 marcadores microsatélites.
- Estimar la diversidad genética en ocho líneas endogámicas de maíz con el empleo de 20 marcadores microsatélites.

III. MARCO DE REFERENCIA

El maíz es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen. Pertenece a la familia de las Poáceas (Gramíneas), tribu Maídeas, y es la única especie cultivada de este género. Otras especies del género *Zea*, comúnmente llamadas teocintle y las del género *Tripsacum*, conocidas como arrocillo o maicillo, son formas salvajes parientes de *Zea mays* (Acosta, 2009). Botánicamente, el maíz es una planta alógama, monoica y con polinización típicamente influenciada por el viento (Ortiz *et al.*, 2010).

Corcuera (2012), afirma que el maíz se considera que es un alotetraploide con $2n=4x=20$ (con número básico: $x=5$) derivado a partir de ancestros con $2n=10$ y se reporta la siguiente clasificación botánica:

Familia: Poáceas

Subfamilia.: Panicoideas

Tribu: Maídeas

Género: *Zea*

Especie: *mays* L.

Subespecie: varias

Nombres comunes: maíz, mahí, acecintle, cincocopi, teosinte, teosintle.

El maíz es un cultivo de cereal importante, que puede suministrar alimentos, piensos, forrajes, combustible para uso doméstico y también materias primas para uso industrial. Entre los cultivos de cereales alimentarios, a nivel mundial el maíz ocupa la tercera posición en términos de almacenamiento y producción. Como cultivo versátil, crece con éxito en todo el mundo cubriendo tierras bajas, tropicales, subtropicales y condición climática templada (Elías, 1995 citados por Ivy *et al.*, 2007).

La antigüedad de la evidencia arqueológica en su conjunto y la presencia de los parientes silvestres más cercanos al maíz (los teocintles del género *Zea* y el mayor número de especies del género *Tripsacum*) en territorio mexicano, han convencido a la comunidad científica interesada en el tema que México es el centro de origen de este cereal (Kato *et al.*, 2009).

El maíz surgió aproximadamente entre los años 8 000 y 6 000 AC en Mesoamérica (México y Guatemala), probablemente a lo largo del acantilado occidental de México Central o del Sur, a 500 km de la Ciudad de México (Acosta, 2009).

Mesoamérica es considerado uno de los sitios de domesticación de plantas de mayor relevancia, sobre todo por el maíz, alrededor del cual crecieron las diferentes sociedades que han ocupado esta zona a lo largo de la historia (Carrillo, 2009).

Las tres teorías principales que se sostienen ampliamente sobre el origen del maíz son proviene de: 1. Una forma silvestre de maíz 2. Teocintle silvestre 3. Ancestro desconocido (Acosta, 2009).

El origen del maíz no ha sido sencillo de rastrear. La mazorca es única entre los cereales y de ahí que la dilucidación de su origen haya sido un gran desafío científico (Serratos, 2009). Otra de las características del maíz es la formación de híbridos de mayor vigor al cruzarse las distintas variedades, el intercambio de un sitio a otro se volvió común y su cruce dio origen a nuevas razas (Carrillo, 2009).

Chapman y Peat (1995) citados por González (2009) señalan que, de todos los cereales, el maíz es el que con mayor razón puede considerarse como un artefacto creado por el hombre. Para Galinat (1992) es resultado del proceso más importante y espectacular de mejoramiento de plantas de la historia humana.

El maíz es una de las pocas especies diploides de cultivos alimenticios y tiene un juego básico de diez cromosomas. Otras especies del género *Zea* también son diploides con $2n=20$ Paliwal *et al.*, (2001). Una de las principales características del maíz es su enorme variabilidad y a diferencia de otros cereales cultivados, no se autopoliniza, sino que las flores de una planta polinizan las de otras. La polinización libre proporciona al maíz una gran diversidad genética, por tanto, una riqueza de caracteres que resultan interesantes para este cultivo en ciertas condiciones (Carrillo, 2009).

Cardona (2010) define la diversidad genética como la multiplicidad de frecuencias alélicas presentes en un grupo de individuos, que junto con el ambiente provee la naturaleza del fenotipo y es base fundamental en programas de mejoramiento.

Mohammadi y Prasanna (2003) definen el estudio de la diversidad genética como el proceso por el cual la variación entre individuos, grupos de individuos o poblaciones es analizada por un método específico o por una combinación de métodos. Mientras que Furnier (1997) destaca que una gran cantidad de la variación genética reside dentro de especies, entre y dentro de poblaciones. Los procesos evolutivos que moldean la variación dentro de especies son los mismos que crean la diversidad entre especies.

De acuerdo con Franco e Hidalgo (2003) citados por Hernández (2013), toda la variabilidad es almacenada en el genoma de los miembros de la población y puede expresarse en características visibles o fenotípicas y en características no visibles llamadas genotípicas.

El maíz es una especie que se caracteriza por su gran potencial de uso, gracias a su amplia diversidad genética. La variabilidad de sus alelos, es el reflejo de un largo proceso de domesticación en diferentes condiciones ambientales y culturales en Mesoamérica (Kato *et al.*, 2009).

González *et al.*, (2009) citan a Xia *et al.*, (2004) y a Hernández (2007) quienes atribuyen al conocimiento de la diversidad genética entre el germoplasma de mucha importancia para el cultivo de maíz híbrido, al momento de planear cruces entre germoplasma elite, al desarrollar nuevas líneas endocriadas y al asignar genotipos a determinados grupos heteróticos.

Carrillo (2009) menciona entre la variabilidad que distingue al maíz entre otras: hay variedades cuya altura no pasa de un metro y medio, mientras otras llegan hasta cinco; la longitud de las mazorcas va de siete a treinta y dos centímetros, aunque la mayoría mide entre quince y veinte centímetros. Su forma puede ser cónica, cilíndrica, casi redonda, elipsoide, alargada, corta, delgada, ancha, así como una combinación de estas características, con un raquis delgado o ancho.

A partir de los años 60 se comenzó a producir semilla híbrida en gran escala; ello se debió a los excelentes cruzamientos entre líneas puras americanas que aportaban rendimiento con las europeas, que a su vez aportaron la precocidad y tolerancia al frío (Hallauer y Miranda, 1988).

Betrán *et al.*, (2003) y Nestares *et al.*, (1999), destacan que, en los programas destinados a obtener híbridos de maíz, el conocimiento de las relaciones genéticas entre las líneas es de gran utilidad para la planificación de los cruzamientos que darán origen a los híbridos.

Boto (2017) reporta que desde los tiempos de Aristóteles se han venido utilizando diferentes caracteres morfológicos (forma, tamaño, color) para tratar de agrupar y clasificar a los organismos vivos. Estos caracteres fenotípicos han venido siendo la base de la taxonomía biológica durante dos siglos, desde que Linneo propusiera su sistema binomial para la clasificación de los seres vivos en el siglo XVIII.

Moreno-González (1997), menciona que la posibilidad de usar marcadores morfológicos como una ayuda en la selección de caracteres cualitativos y cuantitativos en plantas fue sugerida por Sax en 1923. El objetivo principal de la caracterización morfológica es medir la variabilidad genética de una colección mediante el uso de descriptores definidos (Hernández, 2013).

Tradicionalmente la caracterización se basó en la observación de caracteres morfológicos de la semilla, de la inflorescencia o de la planta, careciendo muchas veces de objetividad y definición por la acentuada influencia ambiental (Bonamico *et al.*, 2004).

La caracterización y evaluación no debe realizarse sólo a través de variables morfológicas que pueden depender de las condiciones ambientales; además, la mayoría de los caracteres de importancia económica sólo puede identificarse una vez que la planta haya comenzado su producción (Espósito *et al.*, 2011).

Gale (1994) citado por Pérez de la Vega (2013), define al marcador genético como cualquier medio para identificar cualquier locus específico en un cromosoma. De acuerdo con Arús *et al.*, (2001), los marcadores son polimorfismos genéticos de cualquier tipo que tienen una herencia mendeliana simple. Se usan como señales genéticas que nos permiten detectar la presencia de un gen, de un cromosoma, o de un gameto en un individuo o en una población.

Los primeros marcadores genéticos descritos fueron los marcadores morfológicos, que se basan en diferencias fenotípicas debidas a genes con efectos mayores y que presentan herencia simple y expresión estable en diferentes ambientes (Nuez y Carrillo, 2000).

La caracterización morfológica es el primer paso en el mejoramiento de los cultivos y programas de conservación. Las características morfológicas se han venido utilizando para estudiar la diversidad genética, identificar plantas cultivadas y conservar los recursos genéticos (Onamu *et al.*, 2012). En maíz, ha resultado ser eficaz para generar información acerca de la relación filogenética entre las variedades locales, híbridos y sus parientes silvestres (Luo *et al.*, 2011).

Silva *et al.*, (2009), reportan que Galovic *et al.*, (2006) puntualizan que las líneas progenitoras de los híbridos liberados comercialmente deben ser caracterizadas y descritas por el mejorador de plantas, puesto que la acertada elección de los progenitores representa el éxito del producto final.

La evaluación de líneas de maíz *per se* debe adoptarse en el proceso de mejoramiento genético, con el objeto de tener su caracterización, incluyendo los datos sobre su potencialidad como hembra o macho en la formación de híbridos. A medida que en los programas se adquiere más experiencia, se hace necesario identificar cuáles líneas serán utilizadas como hembras y cuales como polinizadores (San Vicente, 2007).

La caracterización de cultivares de maíz tiene una aplicación práctica importante en el mejoramiento vegetal, tanto para la identificación de genotipos comerciales como para la estimación de relaciones genéticas (Bonamico *et al.*, 2004). En la práctica, la caracterización de los híbridos y sus líneas parentales es el resultado de llevar a cabo una serie de experimentos bajo diferentes ambientes de evaluación y prácticas de manejo (Silva *et al.*, 2009).

Algunos de los problemas principales asociados al uso de marcadores morfológicos son: la necesidad de esperar a que la planta sea adulta para ver el fenotipo del carácter morfológico, su número limitado y los efectos deletéreos y fenotipos indeseables asociados a algunos de estos marcadores. Además, suelen ser de expresión dominante, frecuentemente enmascarados por efectos epistáticos e influencias ambientales (Arús *et al.*, 2001).

El gran desarrollo de la biología molecular a mediados del siglo XX, con el hito del descubrimiento del ADN como molécula portadora de la información genética y de los

mecanismos que permiten trasladar esta información a las proteínas, que en definitiva sustentan las morfologías de los organismos, condujo pronto a plantearse la utilización directa de moléculas como marcadores complementarios a los rasgos morfológicos para establecer relaciones entre los diferentes grupos biológicos y a diferentes niveles (Boto, 2017).

Los marcadores genéticos se han empleado en diferentes fases de la mejora de las plantas: el pre-mejoramiento (conservación y uso de los recursos genéticos, conocimiento y uso del sistema reproductivo, caracterización y pureza de cultivares para emplearlos como progenitores); el mejoramiento (selección de progenitores y monitoreo en los híbridos, selección asistida para caracteres cualitativos y cuantitativos, introgresión de genes desde especies silvestres y el post mejoramiento entre otros (Alvarez, 2011).

Doebley *et al.*, (1985) citados por Bracco (2012) analizaron las razas de México mediante la técnica isoenzimática encontraron altos niveles de variación tanto entre como dentro de las razas analizadas, siendo estos valores comparables a los descritos para los teosintes. Asimismo, se vio que el grado de diferenciación bioquímica entre los maíces Córneos del norte y los Dentados del sur de los EE. UU, respaldaba la división taxonómica previamente propuesta en base a características morfológicas.

La revolución de los marcadores moleculares en la forma de conducir los estudios sobre diversidad genética, incluyen aquellos basados en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) que son rápidos, objetivos, simples y abundantes, no afectados por el ambiente y pueden analizarse en cualquier etapa de desarrollo del cultivo (Onamu *et al.*, 2012).

Los marcadores moleculares son una herramienta muy útil para el mejorador de plantas puesto que le pueden proporcionar datos de ayuda para determinar su origen y estatus de las poblaciones y permite identificar y estudiar regiones específicas del genoma que han sido favorecidas por la selección intensiva. Para ello se utiliza un grupo de marcadores de manera aleatoria pero que sean representativos de todo el genoma, incluyendo los loci que codifican la secuencia del carácter en selección (Kahler *et al.*, 2010; Heredia-Díaz *et al.*, 1996).

Existe una serie de técnicas moleculares empleadas en la caracterización de los maíces y diferentes gramíneas, como los RFLP (restriction fragment length polymorphism), AFLP (amplified fragment length polymorphism), SSR (simple sequence repeat), RAPD (random amplified polymorphic DNA), SNPs (single nucleotide polymorphisms) y los ISSR (Intersimple sequence repeat) o intermicrosatélites (Mbuya *et al.*, 2012, citados por Hernández-Ramos *et al.*, 2017).

La ventaja que tienen los marcadores moleculares de ser fenotípicamente neutros, es que presentan codominancia y muchos polimorfismos, pueden ser evaluados en cualquier estado de desarrollo de la planta y en cualquier época del año sin que haya interferencia de efectos epistáticos o epigenéticos (Gutiérrez *et al.*, 2016). Para Arús *et al.*, (2001) reportan entre las ventajas de los marcadores moleculares la rapidez y simplicidad en la detección y el bajo costo.

Los marcadores para ser considerados polimórficos tienen que reunir una serie de características que son: alto grado de polimorfismo, herencia mendeliana codominante, simplicidad en la identificación y análisis, posibilidad de detección en las primeras fases de desarrollo de la planta, aparición frecuente a lo largo del genoma, que no se vea influenciado por el ambiente, fácil acceso (disponibilidad) y alta reproducibilidad (Pérez, 2013).

Zane *et al.*, (2002), citados por Ferreira (2011), afirman que el origen del polimorfismo puede deberse a un deslizamiento en la replicación del ADN en el cual una cadena, ya sea la nueva o la cadena patrón, se desliza sobre la otra en al menos una unidad de repetición. Otras posibles causas de generación de polimorfismos se deben a otros tipos de mutaciones, como son las deleciones e inserciones, que también alterarán el tamaño del microsatélite.

El éxito de los marcadores moleculares, entre otros factores, depende de la heredabilidad del carácter. Así, por ejemplo, la herencia poligénica, dominancia parcial o completa, la influencia del ambiente y el tiempo necesario para la evaluación fenotípica en cultivos perennes, son factores que frecuentemente limitan la eficacia de este análisis (Dalla *et al.*, 2003).

Las tecnologías basadas en el empleo de marcadores moleculares son de utilidad no sólo en la caracterización de genotipos, sino también en estudios de similitud o distancia genética, que

permiten obtener una clasificación de los mismos en diferentes grupos (Bonamico, *et al.*, 2004).

El estudio de la variación de los marcadores moleculares sobre las distintas poblaciones, tras su proceso de selección, nos permite clasificar las poblaciones y aporta información sobre los cambios heredados durante su programa de mejora (Labate *et al.*, 2000). En este sentido, el uso de marcadores como los microsatélites se ha generalizado en estudios de diversidad genética y de estructura genética de poblaciones por su herencia mendeliana, alta confiabilidad, repetitividad y automatización, y pueden detectar homocigosis y heterocigosis en organismos diploides como el maíz (Matsuoka *et al.*, 2002).

Los microsatélites son regiones de secuencias pequeñas (2-10 bases) repetidas arregladas en serie, que se asume están distribuidas por todo el ADN. Son altamente variables y mutables, frecuentemente presentan gran variación y esto permite usarlas para medir el polimorfismo entre especies y variedades relacionadas (Bonamico, *et al.*, 2004 y Azofeifa, 2006, reportados por Gutiérrez *et al.*, 2016).

Dentro de las técnicas de biología molecular para caracterizar y evaluar la diversidad genética de líneas y poblaciones se encuentra el uso de los microsatélites, también llamados SSR, que se caracterizan por ser altamente polimórficos, se encuentran distribuidos al azar a lo largo del genoma, son loci específicos y multialélicos, se heredan de manera mendeliana, son somáticamente estables y codominantes (Junjian *et al.*, 2002, reportados por González *et al.*, 2009).

Las líneas de maíz derivadas de poblaciones tropicales y subtropicales del CIMMYT han sido mejoradas para estabilidad de su comportamiento en cruces a través de pruebas internacionales en un amplio rango de ambientes (Vasal *et al.*, 1999).

La liberación de una línea de maíz del CIMMYT no garantiza una alta capacidad de combinación o un rendimiento en todos los entornos, pero indica que la línea es prometedora o útil como componente híbrido o progenitor para el mejoramiento del pedigrí en uno o más mega entornos objetivos (CIMMYT, 2013).

Las variedades de polinización libre ocupan el 81 % del área sembrada con maíz en los países en desarrollo, y solamente el 19% les corresponde a los materiales híbridos (CIMMYT, 1994). Esto indica que aún existen barreras significativas que limitan la adopción de híbridos. Sin embargo, cuando se ha usado apropiadamente la tecnología para el desarrollo de híbridos, se han logrado mejores rendimientos en muchos países tropicales, particularmente en aquellos donde existen compañías semilleros privadas (Paterniani, 1990).

El objetivo principal de cualquier programa de mejoramiento genético para la obtención de híbridos es producir híbridos de cruza simples involucrando líneas homocigóticas (líneas puras) como progenitores, con el objeto de explotar al máximo la heterosis y obtener híbridos superiores en producción y otras características agronómicas Srinivasan *et al.*, (1993) y Hallauer y Carena (2009) reportados por Caicedo *et al.*, (2017).

Una variedad híbrida es la producida por el cruzamiento entre dos o más parentales elegidos de tal forma que se garanticen la máxima producción y la máxima homogeneidad fenotípica en la explotación comercial. A mano o por medios naturales, en la formación del híbrido se siguen una serie de pasos comunes con independencia del sistema de reproducción (Cubero, 2013).

Hallauer *et al.*, (2010) define la ACG como el comportamiento medio de una línea en combinaciones híbridas y la ACE se refiere al efecto en donde ciertas combinaciones se expresan mejor o peor de lo esperado, con base en el comportamiento promedio de las líneas involucradas. Con respecto al tipo de acción génica que determina la aptitud combinatoria (AC) de las líneas, la ACG está predominantemente asociada a la aditividad, en tanto que la ACE incluye a los efectos de dominancia y epistasis.

CIMMYT Maize Lines (CMLs) son líneas liberadas endogámicas cuidadosamente seleccionadas con buena capacidad de combinación general y con tolerancia a la sequía, eficientes en el uso de nitrógeno, tolerancia al suelo ácido, resistencia a enfermedades, insectos y malezas parásitas, están adaptadas a ambientes tropicales y subtropicales. Los híbridos resultantes pueden ser utilizados ya sea en cruza simples o como progenitores femeninos de híbridos triples o de cruza doble (CIMMYT, 2013).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del estudio

El estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CNIA), perteneciente al Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA), ubicado en el Valle San Cristóbal, km 14.1 Carretera norte, 2. 5 km al sur, Managua, coordenadas geográficas son: 12°05´ latitud norte y 86°09´ longitud oeste con una elevación promedio de 56 msnm.

4.2 Material genético

El material genético de maíz empleado para nuestro estudio fueron líneas endogámicas desarrolladas en el Programa Global de Maíz conjuntamente con el CIMMYT. Estas líneas se destacan por las siguientes características: i. Se adaptan a ambientes tropicales y subtropicales, ii. Poseen buena aptitud o capacidad combinatoria con otras líneas del mismo grupo heterótico, iii. Los híbridos resultantes pueden ser utilizados ya sea en cruza simples o como progenitores femeninos de híbridos triples o de cruza doble (CIMMYT, 2013).

El banco de germoplasma de maíz del CIMMYT facilitó una cantidad limitada de semilla de siete líneas de maíz cuyo registro de código, número de línea CMLs, y su cruce de origen o pedigrí se detalla en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Líneas CML y R₁ de maíz blanco utilizadas para el estudio de caracterización con 20 cebadores en marcadores moleculares tipo SSR

Código de línea	CML	Pedigrí
CLP2404	CML 247	(G24-F119/G24-F54)-6-4-1-1-B
CL02119	CML 254	TUXPSEQ-149-2-B*3-#-#-1-B
CLRCW96	CML 596	(CL04325/CML401)-B-31-1-1-B*6
CLRCW85	CML 573	(CML495/CML401)-B-44-1-B*4-2-B-B
CLWN247	CML 576	(CLFAWW11/CML494)-B-24-2-2-B-B-1-B-8-B-B
CL02129	CML264	P21-C5-F219-3-1-B-#-#-8-1-3-B
CL02504	CML269	P25STE-C1-FS13-6-1-1-B
Desconocido	R ₁	Sin registro

En el Cuadro 2 se presentan sus características morfológicas y de calidad, mientras en el Cuadro 3 se presenta el comportamiento genético de las ocho líneas en cuanto a tolerancia a estrés y resistencia a microorganismos hongos, bacterias y virus específicos. En el caso de la línea R₁ ha sido utilizada por varios años como uno de los progenitores en la obtención de nuevos híbridos simples.

Cuadro 2. Características morfológicas y de calidad de 8 Líneas CML y la línea R₁ de maíz blanco

Código de línea	Número de línea CML	Altura (cm)	Longitud de mazorca (cm)	Adaptación	Textura del grano	Madurez del grano
CLP2404	CML 247	168	17.43	Baja latitud	Semi-dentado	Tardía
CL02119	CML 254	193	17.66	Baja latitud	Semi-dentado	Intermedia
CL02129	CML 264	162	19.25	Baja latitud	Cristalino	Intermedia
CL02504	CML 269	180	13.00	Mediana latitud	Cristalino	Intermedia
CLRCW85	CML 573	181	16.79	Latitudes tropicales de América Latina	Semi-cristalino	Tardía
CLWN247	CML 576	157	16.79	Bajas latitudes tropicales de América Latina	Dentado	Mediana
CLRCW96	CML 596	170	13.73-19.84	Bajas latitudes del tópicico de América Latina	Cristalino	Mediana
R ₁		171	12.5	Latitudes tropicales	Semi-cristalino	Intermedia

Nota: Líneas CML son líneas endogámicas de maíz de alta calidad de proteína (QPM) de grano blanco provenientes del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT).

Cuadro 3. Características capacidad o aptitud combinatoria y de tolerancia al estrés y resistencia de 8 Líneas CML y la línea R₁ de maíz blanco

Número de línea CML	Combina bien con	Tolerancia al estrés y Resistencia
CML 247	POP22, 23, 25, 29, 32, 43	Espiroplasma del achaparramiento del maíz (<i>Spiroplasma kunkelii</i>) y fitoplasma del achaparramiento espeso del maíz (MeS) en la infección mixta
CML 254	POP25, 32, 43; POOL23, 24	Tizón de la hoja
CML 264	POP25, 32, 43; POOL23, 24	Resistencia al virus del mosaico enanizante del maíz (MDMV)
CML 269	CML312, CML442, CKDHL0221	Tolerante a la sequía, resistente al virus del rayado del maíz (MSV), Mancha gris de la hoja (GLS) y Tizón norteño de la hoja del maíz, causado por <i>Exserohilum turcicum</i> pero susceptible a necrosis letal del maíz (MLN)
CML 573	CML494, CML576	Tolera bajo nivel de N, resistencia a la pudrición de la mazorca
CML 576	CML549, CML552, CML573	Sequía y bajo nivel de N, excelente resistencia a mancha de asfalto, causada por <i>Phyllachora maydis</i> , resistencia a tizón sureño de la hoja del maíz y tizón norteño de la hoja del maíz, causado por <i>Exserohilum turcicum</i>
CML 596	CML494, CML576	Tolerante a temperaturas altas, tolera mejor las enfermedades de las hojas y pudrición de la mazorca
R ₁	CML 247, CML 254	Espiroplasma del achaparramiento del maíz (<i>Spiroplasma kunkelii</i>)

En el Cuadro 4 se presentan las secuencias (5' a 3') Forward y la Secuencia (3' a 5') Reverse de los 20 marcadores microsatelitales distribuidos en los 10 cromosomas que tiene el cultivo de maíz.

Cuadro 4. Secuencias de los 20 marcadores microsatélites SSR utilizados en la caracterización de 8 líneas de maíz

Locus	Cromosoma de localización	Secuencia (5' a 3') Forward	Secuencia (3' a 5') Reverse	Rango (pb)
BNLG 1272	9	ACCGAAGATGACGTGTGACA	TCAGTGCAAGGGCATTAG	83-123
PHI 96100	2	AGGAGGACCCCAACTCCTG	TTGCACGAGCCATCGTAT	86-121
PHI 112	7	TGCCCTGCAGGTTACATTGAGT	AGGAGTACGCTTGGATGCTCTTC	180-221
PHI 063	10	GGCGGCGGTGCTGGTAC	CAGCTAGCCGCTAGATATACGCT	55-78
P-UMC 1304	8	CATGCAGCTCTCCAAATTAATCC	GCCAACTAGAACTACTGCTGCTCC	171-200
BNLG 127	9	CATCATAACGAGAAGCACCTAT	ATCGTAACTCAGCGGTTTGTG	158-176
BNLG 1176	8	ACTCCTCAAACCTAGGTGACA	CACCGATGATGGTGAGTACG	96-112
BNLG 197	3	GCGAGAAGAAAGCGAGCAGA	CGCCAAGAAGAAACACATCACA	264-291
BNLG 609	5	GCTCCAGGTCGGAGATGTGA	CACAACACATCCAGTGACCAGAGT	49-84
PHI 057	7	GCTCCAGGTCGGAGATGTGA	CACAACACATCCAGTGACCAGAGT	198-243
BNLG 400	1	AGCTGTGACTGTGAAGGGAAAA	CGTCACACCGCTGTTTCTTG	119-196
UMC 1645	10	CATCGTCATCAGTTCTCCATGAG	GTGATTCACAGAGGCCATCAGAA	105-118
UMC 1845	2	TGGTTGAACTGTAAATGTCCTGA	TGGTAACCAGATTCCCACACAGATG	134-164
PHI 026	4	GCTCCAGGTCGGAGATGTGA	CACAACACATCCAGTGACCAGAGT	126-160
UMC 1792	5	CATGGGACAGCAAGAGACACAG	ACCTTCATCACCTGCAACTACGAC	91-100
NC 013	6	GCTCCAGGTCGGAGATGTGA	CACAACACATCCAGTGACCAGAGT	173-198
BNLG 1600	6	CGATCAGTGCGTGGAGAGTA	TAGGCATGCATTGTCCATTG	150-196
UMC 1073	1	CACCAACGCCAATAGCATCC	GTGGGCGTGTCTCCTACTACTCA	158-206
BNLG 1169	2	GCTCCAGGTCGGAGATGTGA	CACAACACATCCAGTGACCAGAGT	109-110
				154-194
				33-64
				100-127
				185-225
				150-179
				251-295

Nota: Los marcadores descritos en este cuadro No 4, fueron desarrollados en los laboratorios siguientes: Brookhaven National Laboratory of Genetic (BNLG), North Carolina (NC), Pioneer high bred (PHI) y University of Missouri-Columbia (UMC).

4.2.1 Siembra y preparación de tejidos

Como sustrato se utilizó arena colada que previamente se agregó dentro de una olla de presión y se cubrió con agua corriente. La olla de presión se expuso directamente al fuego durante dos horas para lograr su esterilización completa. Una vez que la arena alcanzó la temperatura ambiente, se tomaron 20 semillas de cada línea de maíz y se sembraron en bandejas sin agujeros para germinación.

Después de 8 días de sembradas las semillas con ayuda de una tijera, las plántulas se cortaron hojas jóvenes. Se procedió a la desinfección de los tejidos con alcohol al 70% y luego se esperó que se secaran a temperatura ambiente. Posteriormente, los tejidos se colocaron dentro de bolsas de plástico que se sellaron y se codificaron por cada línea de maíz para proceder a almacenarlas a temperatura de -20°C .

4.2.2 Procedimiento extracción del ADN

La extracción de ADN geonómico se realizó de acuerdo al protocolo propuesto por Jiménez (2009). Por cada muestra se pesaron 15 mg de tejido foliar y se colocó en un tubo Eppendorf (1.5 ml) y se le agregó 200 μl de buffer de extracción y se procedió a macerar cada muestra utilizando pistilos plásticos hasta homogenizarlas, una vez finalizado el proceso de maceración de los tejidos, se le suministró a cada una 26 μl de sulfato dodecil sódico (SDS) al 10% y se mezcló. Una vez finalizado el procedimiento las muestras se colocaron en baño maría a 65°C por 10 minutos (Anexo 1).

Posteriormente a cada muestra se le agregaron 120 μL de acetato de potasio (3M) y se incubaron en hielo durante 20 minutos a continuación las muestras se centrifugaron a una máxima velocidad 18 000 rpm a 5°C por 15 minutos. Concluida la primera centrifugación se procedió a extraer el sobrenadante de cada muestra en cantidad de 200 μl que se transfirió a un tubo Eppendorf limpio y se le agregó 0.6 volúmenes de 2-propanol (120 μl), conservando las muestras a -24°C por 20 minutos.

Se realizó una segunda centrifugación a una velocidad máxima de 18 000 rpm a 5°C por 15 minutos. Luego, el 2-propanol se extrajo del tubo y el pellet fue lavado en 100 μl de etanol (70%) y centrifugado tres veces consecutivas a velocidad máxima de 18 000 rpm a 5°C por 5 minutos. Finalmente, los pellets fueron secados colocando los tubos boca abajo sobre papel absorbente. El ADN se disolvió en 100 μL de buffer TE (conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM EDTA) y las muestras se conservaron a -24°C para su posterior utilización.

4.2.3 Amplificación del ADN

Para el proceso de amplificación del ADN se empleó un termociclador marca Eppendorf Mastercycler con gradiente termociclador. La amplificación de las muestras en PCR fue

llevada a cabo en reacciones de 20 μL mezclando los siguientes componentes de acuerdo con la especificidad de cada marcador: Para los marcadores BNLG 1272 y PHI 96100 se realizó una mezcla de 12 μL de Mastermix, 3 μL agua libre de nucleasas, 2 μL de cada primer (forward y reverse) y finalmente 1 μL de ADN, para obtener 20 μL de producto PCR (Anexo 2a).

Para los marcadores PHI 112, PHI 063, P-UMC 1304, BNLG 127, BNLG 1176, BNLG 197, BNLG 609, PHI 057, BNLG 400, UMC 1645, UMC 1845, PHI 026, UMC 1792, NC 013, BNLG 1600, UMC 1073, BNLG 1169, PHI 119, se realizó una mezcla diferente a los marcadores BNLG 1272 y PHI 96100 y fue de 10 μL de Mastermix, 5 μL agua libre de nucleasas, 2 μL de cada primer (forward y reverse) y finalmente 1 μL de ADN, para obtener de 20 μL de producto PCR (Anexo 2b).

4.2.4 Electroforesis y visualización de los productos de PCR

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador marca Eppendorf Mastercycler. Para la amplificación de las muestras en PCR se utilizó el siguiente programa: Para los marcadores BNLG 1272 y PHI 96100 fue llevado a cabo la desnaturalización del ADN a 94°C durante 5 minutos, seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto; la hibridación a 55°C durante 1 minuto, y alargamiento a 72°C durante 1 minuto, con una elongación final a 72°C durante 10 minutos, finalizando a una temperatura de 4°C (Sequeira *et al.*, 2009).

El programa de amplificación para los 18 marcadores descritos anteriormente, también varió con respecto a los marcadores BNLG 1272 y PHI 96100 en cuanto a la temperatura y los ciclos de desnaturalización: la desnaturalización del ADN a 94°C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación entre 55°C - 59°C durante 1 minuto, y alargamiento a 72°C durante 1 minuto, con una elongación final a 72°C durante 10 minutos, finalizando a una temperatura de 4°C (Anexo 3).

De la muestra de ADN de cada uno de los materiales genéticos, se tomaron 20 μL . Esta muestra de ADN mezclada con el buffer de carga (4 μL de 6x) se depositó en cada uno de los pocillos del gel delimitados con una peinetas de 20 dientes. En cada uno de los extremos de los

pocillos del gel se depositó 4 μL de regla de ADN (ladder) con más de 100 pares de base (pb). Se corrieron las muestras a 90 volt, 330 mA, y 90 minutos.

El ADN tiene cargas negativas y cuando se aplica una corriente, los fragmentos con cargas negativas son atraídos hacia la carga positiva en el otro extremo del gel. Los pequeños fragmentos se mueven rápidamente entre las moléculas del gel, mientras que los fragmentos más grandes trabajan más difícilmente para conseguir moverse a través del gel. En el primer pozo se agregaron 4 μl de ladder y en resto de pozos 16 μl de ADN producto PCR de cada una de las muestras. Se programó la electroforesis a 90 minutos, 330 amperios y 90 voltios.

Para la visualización de los fragmentos de ADN, se elaboró gel de metaphor agarosa al 2%, la cual se preparó diluyendo 1 g L^{-1} de metaphor agarosa en 100 ml de TE 0.5x y 4 μl de bromuro de etidio. La visualización y cuantificación de los fragmentos fue realizada a través de un sistema transluminador ultravioleta utilizando como referencia una escalera molecular con fragmentos de 100-1000 pares de bases. Todos los fragmentos de ADN productos PCR, se visualizaron y cuantificaron, al obtener la fotografía de los geles de metaphor agarosa al 2% (Anexo 4).

Transcurrido el tiempo en la electroforesis se llevó el gel al UPV transluminador Launch Doc-ITL, con cámara Canon de 12.5 mega pixeles, para tomar fotografías las cuales fueron visualizadas con el programa lonch Doc-ITLS software de análisis de imagen, donde se identificaron las bandas de ADN, las que se midieron utilizando el programa Paint a un aumento de 300% mediante cuadrículas y regla con unidad de medidas en pixeles observando la regla de ADN Ladder utilizado en los geles.

4.2.5 Análisis de la diversidad

Para evaluar la diversidad genética se estimaron los parámetros siguientes: número de alelos por locus, (N_a), heterocigosidad esperada (Hesp), heterocigosidad observada (Hobs) y la frecuencia alélica (P_i). Estos cálculos fueron obtenidos haciendo uso del programa GenAlex versión 6 (Peakall & Smouse, 2006).

a. *Número de alelos por locus (Na)*

Constituye todas las formas alternativas que puede presentar un gen en un locus. Se determina por conteo directo de alelos diferentes para cada locus en cada grupo. Este parámetro se determinó con el software de GenAlex versión 6 (Peakall & Smouse, 2006).

b. *Heterocigosidad observada (Hobs)*

Equivale a la proporción de individuos que presenta un par de alelos diferentes, es decir, que son heterocigotos, mediante conteo directo, para cada locus en un grupo (Casalla, 2003).

c. *Heterocigosidad esperada (Hesp)*

Es llamada también índice de diversidad de Weir y estima la proporción de individuos que se espera sean heterocigotos para cada locus en un grupo (Casalla, 2003).

d. *Índice de Shannon (I)*

Para el análisis de diversidad se utilizó el Índice de Shannon el cual consiste en determinar la diversidad de especies o individuos a través de comparaciones. El índice de Shannon se calculó para cada locus usando versión del software GenAlex versión 6 (Peakall & Smouse, 2006).

e. *Contenido de información polimórfica (CIP)*

Para calcular el contenido de información polimórfica (CIP), se usó la siguiente fórmula $CIP=1-\sum (P_i^2)_j$, Donde P_i : Frecuencia alélica del i-ésimo alelo, j el locus. propuesta por (Anderson *et al.*, 1993) citado por Arguello, 2012, que se calculó para cada locus usando versión del software GenAlex versión 6 (Peakall & Smouse, 2006).

f. *Frecuencia alélica*

Es el número de veces que se observa un alelo, dentro del total de alelos para un locus. Es usada para describir toda la información genética presente en un locus (Casalla, 2003).

g. *Distancia genética entre poblaciones*

Se analizó la distancia genética entre dos poblaciones propuestas por Nei (1973) mediante el programa InfoGen/L versión actualizada el 29-09-2020. Los resultados se presentaron en una matriz de distancia conformada por las 8 líneas.

h. Análisis de conglomerado

A partir de la matriz binaria, se conformó un dendrograma con el empleo del algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average) y el coeficiente de Jaccard del programa InfoGen.

4.2.6 Análisis de varianza molecular (AMOVA)

Para cuantificar la diversidad genética se utilizó el análisis molecular de varianza, es un marco de referencia para la estimación de estructura genética a partir de la información contenida en la frecuencia alélica, y el estimador de F-estadística (FST) y a partir de ella se obtienen los componentes de covarianza asociados con posibles niveles de estructura genética, según lo descrito por (Weir & Cockerham, 1984), utilizando el software GenAlex versión 6 (Peakall y Smouse, 2006).

Se realizó el análisis AMOVA aplicando el software GenALEX antes descrito. Se conformaron dos sub-poblaciones de acuerdo a la textura de grano de las líneas, como se detalla en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Ocho líneas clasificadas en dos sub-poblaciones de acuerdo a la textura del grano del maíz

Número de Sub-población	Código de línea CML	Textura del grano
1	CML 247	Semi-dentado
1	CML 254	Semi-dentado
1	CML 576	Dentado
2	CML 264	Cristalino
2	CML 269	Cristalino
2	CML 573	Semi-cristalino
2	CML 596	Cristalino
2	R ₁	Semi-cristalino

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Diversidad genética por locus de las 8 líneas de maíz

5.1.1 Número de alelos

De los 20 marcadores microsatélites empleados en el presente estudio tenían secuencia de nucleótidos localizadas en al menos uno de los diez cromosomas que tiene el maíz como es el caso del marcador BNLG 197 localizado en el cromosoma número 3. Seis marcadores moleculares tenían secuencias de nucleótidos localizadas tres en el cromosoma número 2 y tres en el cromosoma 8.

En el análisis de variabilidad de los 20 locus microsatélites analizados detectaron 80 alelos en las 8 líneas de maíz blanco con un tamaño variable de 80 a 300 bp. El marcador BNLG 1272 identificó los fragmentos con menores rangos comprendidos entre 80-120 pb y el BNLG 1600 identificó el de mayor rango entre 190-300 pb, este marcador fue el único que el rango de pb 190-300 resultó superior a los pb que caracteriza al diseño 185-225 (Cuadro 6).

Los loci expresaron polimorfismos con una media de 4 alelos por locus (rango: 2-6). Los loci que registraron mayor polimorfismo fueron el BNLG 197 con 6 alelos seguido de PHI 026, BNLG 1600, UMC 1845 y el BNLG 1272 con 5 alelos, mientras que el locus que presentó menor número de alelos fue el BNLG 609 con 2 alelos, estas diferencias en el número de alelos pueden ser resultado de las secuencias específicas que tiene cada marcador molecular. Al respecto, Tiessen (2012), considera que un marcador es altamente polimórfico cuando identifica más de dos alelos por locus para que genere una información útil. En el cuadro 5 se presentan patrones de bandas para estos loci.

Morales *et al.*, (2010) empleando 21 marcadores SSR polimórficos para estimar la diversidad genética de la población de 25 líneas de maíz argentino cristalino colorado detectaron 108 alelos. El número de alelos por loci varió de 2 a 14 con una media de 5.14; los 108 alelos fueron suficientes para discriminar completamente las 25 líneas.

5.1.2 Heterocigosidad observada y esperada

El mayor nivel de heterocigosidad observada fue expresada por los locus PHI 96100, BNLG 609, BNLG 127, BNLG 1169 y PHI 119 con valor de 1.000. El mayor nivel de heterocigosidad esperada fue expresado por los loci más polimórficos BNLG 197, PHI 026 y BNLG 1600 que tuvieron un valor similar de 0.833, mientras que el menor valor de heterocigosidad esperada lo expresaron los marcadores BNLG 609 y PHI 057 con valores respectivos de 0.533 y 0.567.

La diversidad genética (H_{esp}) obtenidos para cada locus varió de 0.533 a 0.833 con media de 0.673 que resultó similar a los valores de la media de H_{esp} de 0.68 logradas por Morales *et al.*, (2010), aunque los valores para cada locus variaron de 0.36 a 0.90. El valor alto de la media de heterocigosidad esperada 0.673 indica la presencia de alta variación alélica (diversidad) en los loci marcadores y revela la presencia de alto nivel de polimorfismo en los materiales estudiados. Esto se observa con el locus BNLG 197, que tuvo un valor de heterocigosidad esperada de 0.833 y valor PIC de 0.754 (Cuadro 6).

Bante y Prasanna (2003), caracterizaron 23 líneas tropicales con 36 SSR, determinaron una media de 3.25 alelos por locus, media que es inferior a la obtenida en nuestro estudio. Abebe *et al.*, (2020) para el estudio de 36 líneas de maíz de Etiopía utilizaron 29 marcadores microsatelitales de los cuales 28 resultaron polimórficos identificando un total de 104 alelos, además encontraron que en 20 de ellos se alcanzó el máximo de expresión homocigota. Estos mismos autores reportan una media en número de alelos de 3.71 que resultó inferior a la media de 4 alelos obtenidos en el presente estudio.

Estas variaciones se deben a que cada microsatélite codifica una región específica del ADN de cada genotipo y a la variación en tamaño de cada microsatélite. La heterocigosidad esperada en el presente estudio se cataloga como alta porque se obtuvieron valores mayores a 0.5, es decir que existe alta diversidad genética cuando se acerca a 1 y baja diversidad cuando el valor se acerca a 0 como lo valora Zaldivar (2006).

Pardo *et al.*, (2017) utilizando 12 marcadores microsatélites en 30 accesiones de maíz criollo reportan una heterocigosidad observada con un rango entre 0.172 y 0.466 correspondientes a los marcadores BNLG1520 y PHI 056 y con un promedio de 0.280.

5.1.3 Contenido de Información Polimórfica (CIP)

Estimación de la diversidad que permite clasificar los marcadores genéticos según su nivel de polimorfismo y mide la capacidad discriminatoria de los loci, en dependencia del número de alelos y la frecuencia de cada alelo en el locus marcador (Murillo, 2010), citado por Arguello, 2012. Mathias *et al.*, (2007) destacan que el CIP calculado para un marcador puede variar entre 0 y 1, indicando mayor nivel de polimorfismo o variación cuando el valor es más cercano a 1.

El valor del PIC de las muestras analizadas osciló en un rango de 0.375 y 0.754, con un promedio de 0.615. (Cuadro 6). El 90% de los marcadores resultaron muy informativos presentando valores de PIC superiores 0.50 y por lo tanto pueden ser considerados útiles para detectar variabilidad genética. Los loci que presentaron un mayor polimorfismo fueron los comprendidos en el rango de valores PIC entre 0.605 y 0.754 (BNLG 197, BNLG 1600, PHI 026 y BNLG 1272, PHI 112, PHI 063, BNLG 127, BNLG 1176, BNLG 400, UMC 1645, UMC 1845, UMC 1792, NC 13 y UMC 1073). Los marcadores que presentaron los niveles más bajos de polimorfismo fueron el BNLG 609 y PHI 057 con valores respectivos de 0.375 y 0.468 (Cuadro 6).

Los datos obtenidos del valor de PIC muestran que los microsatélites utilizados en este estudio superaron al promedio de 0.57 reportado por González (2012) que empleó 30 marcadores SSR en 196 poblaciones de maíz tropical mexicano. También superó a los valores de PIC obtenidos por González, *et al.*, (2009), quienes caracterizaron de 35 líneas de maíz blanco empleando 12 marcadores SSR, reportando un valor inferior en el contenido de información polimórfica (PIC), que varió entre 0.03 y 0.57 con un valor promedio de 0.41.

El alto promedio del valor PIC obtenido en el presente estudio puede ser resultado de otro factor como es que todos los marcadores moleculares se diseñaron para el cultivo de maíz como lo reportan diferentes actores.

Morales (2002) para la caracterización de 32 líneas de maíz (EEA INTA-Pergamino) junto con dos poblaciones sintéticas, utilizó 21 marcadores microsatélites. Obtuvo una media de 6 alelos por locus, variando los contenidos de información polimórfica de las líneas entre 0 y

0.90, con una media de 0.65. En el presente estudio se probaron 9 de esos 21 marcadores de microsatélites.

De acuerdo al número de alelos por locus se observó que al resultar mayor su número, se incrementaron los valores de Hesp y el valor PIC, como resultó con el locus BNLG 197 que presentó 6 alelos y los valores obtenidos de Hesp y PIC fueron los mayores (0.833 y 0.754 respectivamente).

5.1.4 Diversidad Índice de Shannon

El índice de diversidad de Shannon (I), es típicamente usado para medir el número de especies en una comunidad (la riqueza) y la relativa frecuencia de estas especies. El índice contempla la cantidad de especies presentes en el área de estudio, riqueza de especies y la cantidad relativa de individuos de cada una de esas especies abundantes (Di Betetti, 2000). Griffon, (2008) reporta que el índice de Shannon tiene un valor alto cuando es mayor a 3 que indica mayor diversidad y que los individuos son muy diferentes.

El índice de diversidad de Shannon presentó una media de 2.00 y el 65% de los 20 marcadores presentaron un índice entre 2.00 y 2.07. Los menores valores de (I) se obtuvieron con los marcadores PHI 112 y BNLG1176 con índices respectivos de 1.88 y 1.89, mientras que los marcadores que lograron mayor índice fueron PHI 119 y PHI 063 ambos con índice de 2.07. Los marcadores P-UMC 1304, BNLG 197 y BNLG 609 el índice fue de 2.06 y con un índice similar de 2.05 presentaron los marcadores PHI 96100 y NC 13. Los resultados se observan en el Cuadro 6.

Estos resultados expresan que es alta diversidad genética de las 8 líneas estudiadas, incluso superando a los reportados por Lacayo y Ponce (2018) quienes realizaron una caracterización molecular utilizando 15 marcadores microsatelitales tipo SSR en tres generaciones, G₀, G₂, G₃, de maíz criollo pujagua rojo obteniendo un índice de diversidad de Shannon con media de 1.25, con un índice menor con media de 0.08 e índice mayor con media de 1.92.

El mayor porcentaje de frecuencia alélica se presentó en el marcador BNLG 609 con el 50%, pero se obtuvieron los valores más bajos en número de alelos, heterocigosidad esperada, valor PIC. En el caso del índice de Shannon el marcador BNLG 609 fue superior al 75% de los

marcadores estudiados, por tanto, es un marcador que detectó diversidad genética en las líneas evaluadas. Los marcadores BNLG 197 y PHI 026 presentaron una frecuencia alélica del 17% y los resultados fueron opuestos a los valores e índices que se obtuvieron con el marcador BNLG 609 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Parámetros de diversidad genética en 20 marcadores microsatelitales, usados en la evaluación molecular de 8 líneas de maíz

Locus	Rangos (pb)	Na	H _{obs}	H _{esp}	PIC	Frecuencia Alélica (%)	I
PHI 96100	90-120	3	1.000	0.633	0.511	20	2.05
BNLG 1272	80-120	5	0.875	0.800	0.712	20	2.01
PHI 112	180-220	4	0.500	0.767	0.667	20	1.88
PHI 063	170-200	4	0.875	0.767	0.667	25	2.07
P-UMC 1304	160-180	3	0.625	0.633	0.511	25	2.06
BNLG 127	260-290	4	1.000	0.767	0.677	20	1.98
BNLG1176	200-240	4	0.125	0.700	0.605	20	1.89
BNLG 197	120-200	6	0.875	0.833	0.754	17	2.06
BNLG 609	110-120	2	1.000	0.533	0.375	50	2.06
PHI 057	130-160	3	0.625	0.567	0.468	33	1.99
BNLG 400	130-160	4	0.125	0.733	0.630	25	1.91
UMC 1645	170-200	4	0.875	0.700	0.605	25	2.02
UMC 1845	150-200	5	0.875	0.733	0.653	20	2.03
PHI 026	160-210	5	0.750	0.833	0.746	17	2.03
UMC 1792	150-190	4	0.625	0.700	0.605	31	2.00
NC 13	100-130	4	0.875	0.767	0.667	25	2.05
BNLG 1600	190-300	6	0.625	0.833	0.746	20	1.94
UMC 1073	150-180	4	0.625	0.700	0.605	20	2.01
BNLG 1169	250-290	4	1.000	0.600	0.524	20	1.94
PHI 119	180-200	3	1.000	0.700	0.582	33	2.07
Promedio	157-196	4.05	0.744	0.715	0.616	24.300	2.003

Rangos de pares de bases (pb) de los marcadores microsatélites, número de alelos encontrados (Na), heterocigosidad observada (H_{obs}), heterocigosidad esperada (H_{esp}), contenido de información polimórfica (PIC) e índice de Shannon por locus (I).

5.2 Diversidad genética por línea

5.2.1 Número de alelos

Los índices de diversidad genética de los marcadores estudiados en las 8 líneas, teniendo como resultado que las líneas CML 247, CML 596 y CML 269 presentaron un número de 9

alelos; mientras que la línea CML 573 presentó el menor número de alelos con 7 (Cuadro 7).

5.2.2 Heterocigosidad observada y esperada

La heterocigosidad observada con valor medio de 1.00, esta no reflejó variación entre las líneas, es decir que la heterocigosidad se mantiene debido a la heterosis que es un fenómeno común en el maíz al ser una planta de polinización cruzada (Zaldivar, 2006), que pueden ser confirmados con los resultados reportados por Londoño (2011), cuando estudió la diversidad genética de 202 genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) por medio de SSR fluorescentes, obteniendo una heterocigosidad observada de 0.11 la cual es considerada por Kwak y Gepts (2009) como muy baja y es característico de especies autógamias.

La heterocigosidad esperada obtuvo una variación de 0.754 a 0.798, con media de 0.776, resultando que el mayor índice de heterocigosidad esperada lo expresó la línea CML 247 con valor de 0.798, seguido por la línea CML 576 con valor de 0.785; mientras que la línea CML 573 obtuvo menor heterocigosidad esperada con valor de 0.754, como se observa en el cuadro 7. La heterocigosidad esperada se considera alta cuando expresa valores mayores a 0.5 y baja cuando se acerca a 0; por tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio se encuentran entre valores que indican que existe una diversidad genética alta.

El mayor valor de PIC se registró en la línea CML 247 con valor de 0.750 y el menor valor se presentó la línea CML 573 con PIC de 0.699; resultando una media del PIC en las 8 líneas de 0.724 (Cuadro 7).

5.2.3 Índice de Shannon

Las 8 líneas presentaron una media del índice de diversidad de Shannon de 1.86, el menor valor lo obtuvieron las líneas R₁, CML 269, CML 596 con un índice de 1.85 y el mayor índice lo presentó la línea CML 254 con valor de 1.87. Griffon, (2008) cataloga el índice de Shannon como alto, cuando los valores son mayores a 3 que indican una mayor diversidad y con individuos muy diferentes. Si consideramos este índice, en el presente estudio los resultados denotan que entre las 8 líneas de maíz la diversidad es media y son genéticamente muy parecidas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Parámetros de diversidad genética por líneas utilizando marcadores microsatélites

LINEAS	Na	Hobs	Hesp	PIC	I
CML 247	9	1.000	0.798	0.750	1.86
CML 254	8	1.000	0.780	0.729	1.87
R₁	8	1.000	0.773	0.720	1.85
CML 573	7	1.000	0.754	0.699	1.86
CML 596	9	1.000	0.765	0.711	1.85
CML 576	8	1.000	0.785	0.733	1.86
CML 264	8	1.000	0.781	0.728	1.86
CML 269	9	1.000	0.774	0.720	1.85
PROMEDIO	8.250	1.000	0.776	0.724	1.86

Número de alelos encontrados (Na), heterocigosidad observada (H_{obs}), heterocigosidad esperada (H_{esp}), contenido de información polimórfica (PIC) e índice de Shannon por locus (I).

5.2.4 Frecuencia alélica de los marcadores

La identificación del individuo queda descrita por el conjunto total de alelos obtenidos por cada uno de ellos, lo que se conoce como patrón alélico. De acuerdo con Pejic *et al.*, (1998), la comparación de patrones alélicos, mediante coeficientes de similitud, permite establecer grupos de individuos con características génicas similares.

Las frecuencias alélicas oscilaron entre los valores de 0.735 y 0.779. En las líneas que se identificaron mayores frecuencias alélica fueron CML 247, CML 576, CML 264 y CML 254 y la línea que presentó menor frecuencia alélica fue CML 573.

Sánchez – Vanesa *et al.*, (2014) con 9 marcadores moleculares microsatélites caracterizaron 86 accesiones de maíz encontrando que las frecuencias alélicas oscilaron entre los valores de 0.0022 y 0.8531 observando la mayor frecuencia con el locus PHI 50. Estos autores citando a Galindo y Milagro (2011), quienes señalan que, si la frecuencia de un alelo es alta, existe poca heterocigosidad.

5.3 Frecuencias alélicas por marcador microsatélite

5.3.1 Frecuencia alélica de locus PHI 96100

De acuerdo con De Vicente *et al.*, (2004) la frecuencia alélica se define como una medida de la presencia continua o asidua de un alelo en una población, o de la proporción que representa de todos los alelos de un gen.

El locus PHI 96100 presentó 3 alelos, encontrándose el alelo 110 en las líneas CML 254, CML 573, CML 576 y CML 269 representando el 50% del total de las líneas evaluadas y con un valor de frecuencia alélica de 0.500; en el alelo 120 se presentó en las líneas R₁, CML 596 y CML 264 que representan el 37.50% del total de líneas evaluadas. El alelo 90 únicamente se presentó la línea CML 247 que corresponde a la evaluación del 12.5% del material genético y logrando un valor de frecuencia alélica de 0.125. (Figura 1).

5.3.2 Frecuencia alélica locus BNLG 1272

En el locus BNLG 1272 se presentaron 5 alelos de los cuales el alelo 90 se encontró en las líneas CML 596, CML 576 y CML 264 (37.50%) con frecuencia alélica respectiva de 0.375; el alelo 110 se presentó en las líneas CML 247 y R₁ que representan el 25% de las líneas evaluadas correspondiéndoles una frecuencia alélica de 0.250 y los alelos 80, 100 y 120 detectados respectivamente en las líneas CML 269, CML 573 y CML 254 representando 37.50% de las líneas analizadas y cada alelo con valor de frecuencia de 0.125. (Figura 1).

5.3.3 Frecuencia alélica locus PHI 112

En el locus PHI 112 se encontraron 4 alelos, entre ellos el alelo 200 que se presentó con valor de frecuencia alélica de 0.375 que resultó ser el más alto. Este alelo se localizó en las líneas CML 254, R₁ y la CML573 representando el 37.5% de las líneas evaluadas; el alelo 210 con valor de frecuencia alélica de 0.250 encontrado en las líneas CML 596 y CML 264, mientras que el alelo 220 con frecuencia alélica de 0.250 se detectó en las líneas CML 576 y CML 269. En la línea CML 247 el alelo 180 presentó el menor valor de frecuencia alélica con 0.125. (Figura 1).

5.3.4 Frecuencia alélica locus PHI 063

El locus PHI 063 presentó 4 alelos, resultando el alelo 190 con el mayor valor de frecuencia alélica de 0.375 encontrándose en las líneas CML 573, CML 264 y la CML 269 (37,50% de todas las líneas); el locus 180 se presentó en las líneas CML 254 y R₁ (25%) con frecuencias alélicas respectivas de 0.25. En el locus 200 la frecuencia fue de 0.25 y se encontró en las líneas CML 596 y CML 576 (25%). El locus 170 se encontró únicamente en la línea CML 247 (12.5%) registrándose el menor valor de frecuencia alélica con 0.125. (Figura 1).

5.3.5 Frecuencia alélica locus P-UMC 1304

Se observó que en locus P-UMC 1304 se encontraron 3 alelos, resultando el alelo 160 el que presentó mayor frecuencia alélica con valor de 0.50 en las líneas CML 247, CML 573, CML 264 y la CML 269 que representan el 50% del total de líneas evaluadas; mientras que el alelo 170 con valor de frecuencia de 0.375 se encontró en las líneas R₁, CML 596 y CML 576 (37.50% del total de líneas). En el alelo 180 únicamente se encontró en la línea CML 254 (12.50%) con valor de frecuencia alélica de 0.125 (Figura 1).

De los 5 locus evaluados únicamente en los locus PHI 96100 y P-UMC 1304 la frecuencia alélica obtuvo un valor de 0.50 en el 50% de las líneas evaluadas. El menor valor de frecuencia alélica de 0.125 se presentó en al menos una línea de los cinco locus evaluados y entre estas la línea CML 247 se encontró en los locus PHI96100, PHI 112, BNLG 1272 y PHI 063.

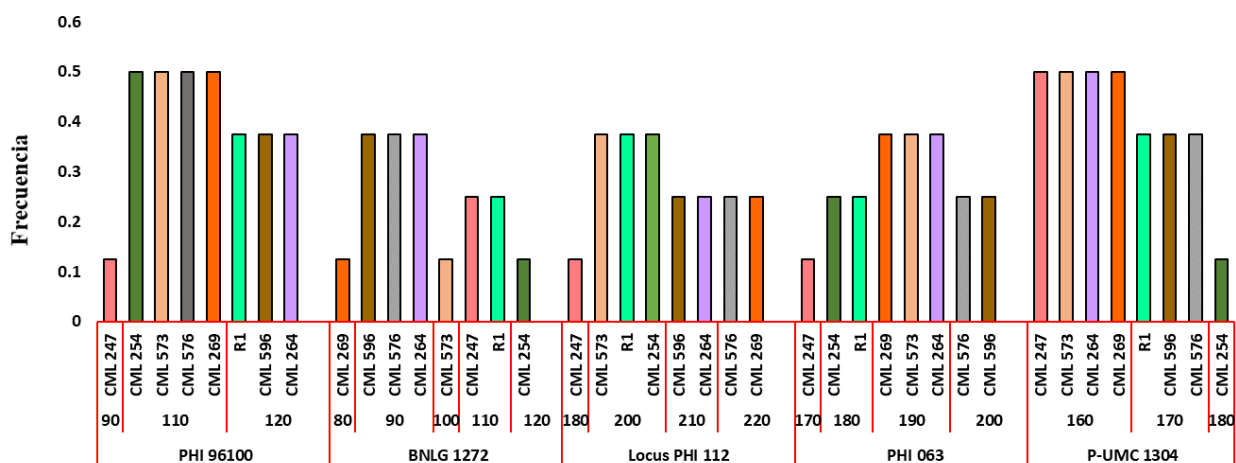


Figura 1. Frecuencia alélica de los marcadores microsatélites PHI 96100, BNLG 1272, PHI 112, PHI 063 y P-UMC 1304 analizados en 8 líneas de maíz.

5.3.6 Frecuencia alélica locus BNLG 127

Se encontraron 4 alelos en el locus BNLG 127 entre ellos el alelo 280 presentó el mayor valor de frecuencia alélica con 0.375 encontrándose en las líneas CML 573, CML 596 y CML 264 correspondiente al 37.50% del total de líneas evaluadas; el alelo 260 se expresó en las líneas CML 247 y CML 269 que representan el 25% del total de líneas cada uno con una frecuencia alélica de 0.250 y el alelo 290 presente en las líneas CML 254 y R₁ que también representan el

25% del total de líneas evaluadas; en ambos alelos el valor de la frecuencia alélica fue de 0.25. El alelo 270 únicamente se encontró en la línea CML 576 (12.50%) que presentó la menor frecuencia alélica con valor de 0.125 (Figura 2).

5.3.7 Frecuencia alélica locus BNLG 1176

En el locus BNLG 1176 se encontraron 4 alelos, entre ellos se destaca el alelo 230 que se encontró en el 50% de las líneas evaluadas (CML 247, CML 254, R₁ y CML 573) resultando una frecuencia alélica con valor de 0.50. En las líneas CML 596 y CML 264 (25%) se encontró el alelo 210 con frecuencia de 0.250; mientras que las líneas CML 269 (12.50%) y CML 576 (12.50%) se presentaron los alelos 200 y 240 ambos con valor de frecuencia alélica de 0.125 (Figura 2).

5.3.8 Frecuencia alélica locus BNLG 197

Se encontraron 6 alelos en el locus BNLG 197, presentándose el alelo 190 con una frecuencia alélica de 0.375 en las líneas CML 247, R₁ y CML 573 que representan el 37.50% del total de líneas evaluadas; mientras que los alelos 120, 160, 170, 180 y 200 se detectaron respectivamente en las líneas CML 269, CML 264, CML 576, CML 596 y CML 254 cada una de ellas representan el 12.50% y la frecuencia alélica obtuvo un valor de 0.125 (Figura 2).

5.3.9 Frecuencia alélica locus BNLG 609

El locus BNLG 609 se encontraron 2 alelos que presentaron igual valor de frecuencia alélica de 0.50, el alelo 110 se encontró en las líneas CML 247, CML 254, R₁ y CML 269 que representan el 50% del total de líneas analizadas, mientras que el alelo 120 se presentó en las líneas CML 573, CML 596, CML 576 y CML 264 que representan el otro 50% de las líneas (Figura 2).

5.3.10 Frecuencia alélica locus PHI 057

En el locus PHI 057 se detectaron 3 alelos, resultando que el alelo 160 se detectó en el 62.50% del total de las líneas evaluadas, las líneas que expresaron dicho alelo fueron las siguientes: CML 247, CML 254, R₁, CML 573 y CML 596. El alelo 150 se expresó en las líneas CML 576 y CML 264 (representaban el 25% de las líneas) con valor de frecuencia alélica de 0.250.

En el alelo 130 se encontró en la línea CML 269 (12.50%) con valor de frecuencia alélica de 0.125 (Figura 2).

De los 5 locus anteriormente evaluados, en la línea CML 269 se expresó la menor frecuencia alélica con valor de 0.125 en los locus BNLG 1176, BNLG 197 y PHI 057, también en la línea CML 576 el menor valor de la frecuencia alélica de 0.125 se presentó en los locus BNLG 127, BNLG 117 y 6BNLG 197.

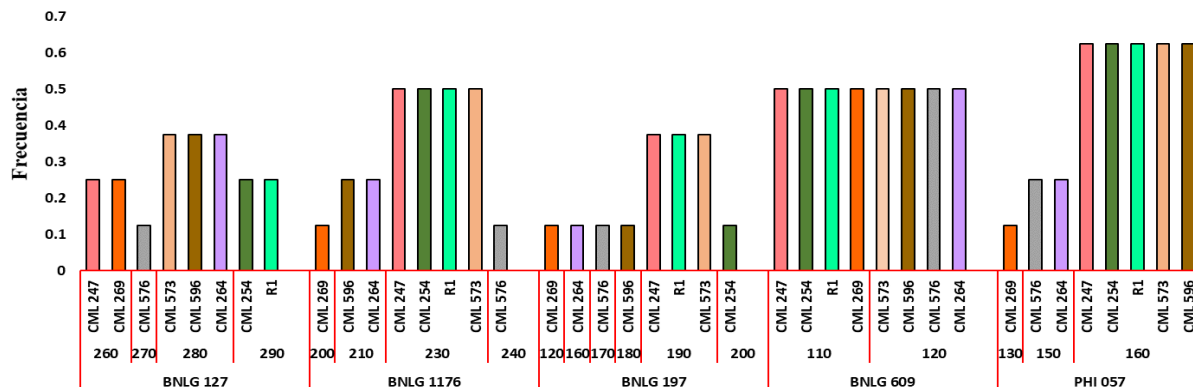


Figura 2. Frecuencia alélica de los marcadores microsatélites, BNLG 127, BNLG 1176, BNLG 197, BNLG 609 y PHI 057 analizados en 8 líneas de maíz.

5.3.11 Frecuencia alélica locus BNLG 400

En el locus BNLG 400 se presentaron 4 alelos, en el alelo 130 con frecuencia alélica de 0.375 se detectó en las líneas CML 247, R₁ y CML 573 que representan el 37.50% del total de las líneas; en el alelo 140 con valor de frecuencia de 0.375 se encontró en las líneas CML 254, CML 596 y CML 576 correspondiente al 37.50% del total de líneas estudiadas. En los alelos 150 y 160 en cada uno con frecuencia alélica de 0.125 se expresó en el 25% de las líneas (CML 264 y la CML 269) (Figura 3).

5.3.12 Frecuencia alélica locus UCM 1645

Los alelos 170, 180, 190 y 200 se encontraron en el locus UCM 1645, entre ellos el alelo 190 con un valor de frecuencia de 0.50 se presentó en las líneas CML 247, CML 254, CML 596 y CML 576 que representa el 50% de las líneas estudiadas. El alelo 200 con valor de frecuencia alélica 0.250 se encontró en las líneas R₁ y CML 573. Los alelos 170 y 180 se presentaron con valor de frecuencia de 0.125 en las líneas CML 269 y CML 264 (Figura 3).

5.3.13 Frecuencia alélica locus UCM 1845

En el locus UCM 1845 se localizaron los alelos 150, 160, 180, 190 y 200, entre ellos el alelo 180 fue en el que se encontró en el 50% de las líneas (CML 573, CML 576, CML 264 y CML 269) presentando el alelo un valor de frecuencia de 0.500. Los alelos 150, 160, 190 y 200 se presentaron respectivamente en las líneas CML 247, R_I, CML 596 y CML 254 cada uno con una frecuencia alélica de 0.125 (Figura 3).

5.3.14 Frecuencia alélica locus PHI 026

En el locus PHI 026 se expresaron 5 alelos, entre ellos los alelos 160, 180 y 200 que se encontraron en 6 líneas de las 8 evaluadas representando el 75%, cada uno de los alelos con un valor de frecuencia de 0.250. El alelo 160 se presentó en las líneas CLM 246 y R_I; mientras que el alelo 180 se detectó en las líneas CML 254 y CML 269 y el alelo 200 se presentó en las líneas CML 573 y CML 596 en los tres alelos el valor de frecuencia fue de 0.250. Los alelos 170 y 210 fueron los que presentaron menor valor de frecuencia alélicas con 0.125 y se encontraron en las líneas CML 576 y CML 264 respectivamente (Figura 3).

5.3.15 Frecuencia alélica locus UCM 1792

Los alelos 150, 170, 180 y 190 se expresaron en el locus UCM 1792, encontrándose el alelo 150 en la línea CML 269 que representa el 12.50% de las líneas analizadas correspondiéndole un valor de frecuencia alélica de 0.125; el alelo 170 se detectó en las líneas CML 247 y CML 264 que representan el 25% cada alelo con una frecuencia de 0.250; el alelo 180 fue detectado en la línea CML 254 (12.50%) con una frecuencia alélica de 0.125 y el alelo 190 presente en las líneas R_I, CML 573, CML 596 y la CML 576 que representan el 50% de las líneas analizadas y la frecuencia de cada alelo fue de 0.50 (Figura 3).

El 50% de las líneas tuvieron expresión alélica con calor de 0.50 en los locus UCM 1645, UCM 1845 y UCM 1792. Solamente la línea CML 576 se expresó en los tres locus con el mayor valor de frecuencia alélica. Las líneas CML 264 y 269 se presentaron en tres de los cinco locus evaluados con el menor valor de frecuencia alélica de 0.125.

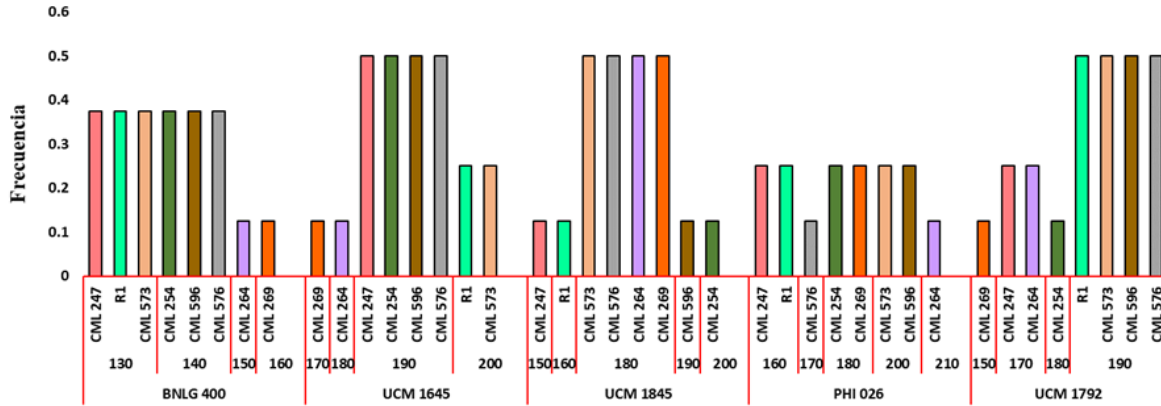


Figura 3. Frecuencia alélica de los marcadores microsatélites, BNLG 400, UCM 1645, UCM 1845, PHI 026 y UCM 1792 analizados en 8 líneas de maíz.

5.3.16 Frecuencia alélica locus NC 13

En el locus NC 13 se expresaron 4 alelos, el alelo 120 se encontró en las líneas CML 247, R₁, CML 573 que representan el 37.50% de las líneas analizadas, cada uno de los alelos con valor de frecuencia alélica de 0.375; el alelo 100 se detectó en las líneas CML 264 y CML 264 ambas constituyen el 25% del total de líneas y el alelo 110 se presentó en las líneas CML 596 y CML 276 que representan el 25% de las líneas. En el caso de las líneas que expresaron los alelos 100 y 110 la frecuencia de cada alelo fue de 0.250. El alelo 130 únicamente se encontró en la línea CML 254 que constituye el 12.50% del total de las líneas analizadas y la frecuencia por alelo fue de 0.125 (Figura 4).

5.3.17 Frecuencia alélica locus BNLG 1600

En el locus BNLG 1600 se detectaron 6 los alelos entre ellos los alelos 200, 210, 230, 300 se expresaron respectivamente en las líneas CML 576, CML 573, CML 254 y CML 596 cada una de ellas representa el 12.50% del total de las líneas y cada alelo presentó un valor de frecuencia alélica de 0.125; el alelo 190 se encontró en las líneas CML 264 y CML 269 que representan el 25% de las líneas y con frecuencia alélica de 0.250 cada una de ellas y el alelo 220 se expresó en las líneas CML 247 y R₁ (25%) en cada una con valor de frecuencia alélica de 0.250 (Figura 4).

5.3.18 Frecuencia alélica locus UMC 1073

El locus UMC 1073 se encontraron 4 alelos de los cuales el alelo 180 se presentó en las líneas CML 573, CML 296, CML 264 y CML 269 que representan el 50% de todas las líneas, expresándose dicho alelo con un valor de frecuencia alélica de 0.50 en cada línea. El alelo 170 se encontró en las líneas R₁ y CML 576 (25% de las líneas analizadas), presentándose con una frecuencia de 0.250 por línea. En este locus se observó que los alelos 150 y 160 se expresaron respectivamente en las líneas CML 247 y CML 254 en ambos casos con valor de frecuencia de 0.125 (Figura 4).

5.3.19 Frecuencia alélica locus BNLG 1169

Se presentaron de 4 alelos en el locus BNLG 1169, resultando que el alelo 290 se encontró en las líneas CML 573, CML 596, CML 576, CML 264 y CML 269 que representan el 62.50% del total de líneas analizadas y presentándose en cada una de ellas un valor de frecuencia alélica de 0.625. Las líneas CML 247, CML 254 y la R₁ representando el 37.50% del total de líneas y se encontraron los alelos 250, 260 y 270 respectivamente cada uno de ellos con un valor de frecuencia de 0.125 (Figura 4).

5.3.20 Frecuencia alélica locus PHI 119

En la figura 20 se observan las frecuencias alélicas del locus PHI 119, encontrándose 3 alelos entre ellos los alelos 180 y 190 que se detectaron en el 75% del total de líneas evaluadas. El alelo 180 se presentó en las líneas CML 247, CML 264 y CML 269; mientras que el alelo 190 se detectó en las líneas CML 254, CML 596 y CML 576. La frecuencia alélica en los dos alelos fue de 0.375. El alelo 200 se presentó en las líneas la R₁ y la CML 573 que representan el 25% de las líneas evaluadas y presentaron una frecuencia alélica de 0.250 (Figura 4).

En alelo 180 del locus UMC 1073 se presentó en el 50% de las líneas con valor de frecuencia de 0.50, pero solo en la línea CML 254 se presentó en tres de los cinco locus evaluados (NC 13, BNLG 1600 y UMC 1073) con el menor valor de frecuencia alélica de 0.125.

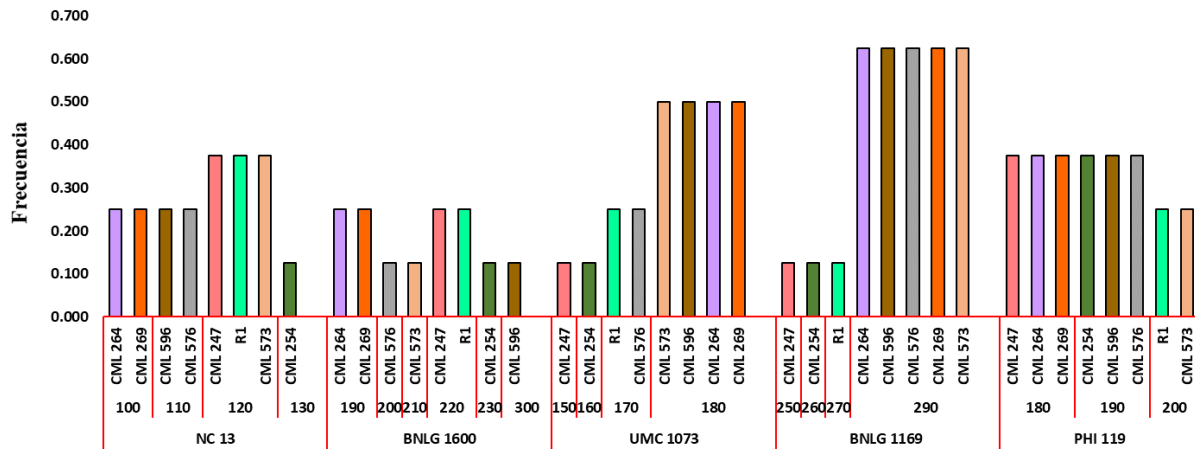


Figura 4. Frecuencia alélica de los marcadores microsateélites, N 13, BNLG 1600, UCM 1073, BNLG1169 y PHI 119 analizados en 8 líneas de maíz.

5.4 Análisis molecular de varianza (AMOVA)

5.4.1 Variación genética dentro y entre las poblaciones de maíz a través del análisis molecular de varianza (AMOVA)

El análisis de las relaciones entre poblaciones de una especie de interés, como es el maíz, es un componente importante en los programas de mejoramiento ya que proporciona información acerca de la diversidad genética de las poblaciones (Mohammadi & Prasanna, 2003).

El análisis de AMOVA reflejó que el 67% de la variabilidad molecular total encontrada se presentó dentro las líneas y un 33 % entre líneas, lo que nos permite concluir que cada una de las 8 líneas de maíz analizadas se obtuvieron a partir de progenitores genéticamente diferentes como es el caso de la línea R₁ que ha estado en producción desde la década de los años 80 del siglo pasado. El método de multiplicación en condiciones de aislamiento de las plantas de cada línea fue efectivo porque garantiza un aceptable grado de pureza genética, por tanto, se controló eficientemente la contaminación con polen proveniente de líneas con estructura genética diferente. Los resultados del AMOVA se presentan en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Análisis molecular de varianza entre y dentro en 8 líneas de maíz

F.V.	SC	gl	CM	Var. Est	Porcentaje de Variación
Entre Subpoblación	11.488	1	11.488	0.000	0%
Entre líneas	69.700	6	11.617	2.871	33%
Dentro de líneas	47.000	8	5.875	5.875	67%
Total	128.188			8.746	100%

Grados de libertad (GL), suma de cuadrados (SC), cuadrado medio (CM), Variación estándar (Var. Est.), porcentaje de variación (% de Variación).

Los resultados de varianza molecular obtenidos en nuestro estudio fueron diferentes a los encontrados por Rojas (2015), que evaluó la diversidad genética de maíz criollo e indígena en Colombia, encontrando gran parte de la diferencia genética dentro de las generaciones con un 88% y solo el 12% se encontró entre ellas. Además, es característico que los loci de microsatélites revelen una alta heterocigosis dentro de la población, lo que produce una baja diferenciación entre ellos, como lo destacan Loveless y Hamrick (1984) quienes señalan que la dispersión de polen y semillas determina los patrones de dispersión de genes dentro y entre poblaciones. Destacando que las plantas alógamas tienen una alta variación genética dentro de las poblaciones y una baja entre ellas.

5.5 Distancia genética

Las líneas CML 247 y CML 269 presentaron mayor distancia genética con índice de 0.83, otra pareja de líneas que presentaron alto índice de distancia genética fueron CML 247 con CML 264; CML 269 con CML 254 y con R₁ las dos parejas con índice de 0.78. La línea CML 247 con la R₁ presentaron la menor identidad genética con índice de 0.51. Los resultados muestran que entre las líneas facilitadas por el Banco de germoplasma del CIMMYT existen progenitores con estructura genética muy similar, pero también hay líneas que su procedencia genética está más distante (Cuadro 9).

Cuadro 9. Distancias genéticas entre pares de líneas de maíz, con valores de las distancias genéticas de acuerdo a Nei (1973)

LÍNEAS	CML 247	CML 254	R ₁	CML 573	CML 596	CML 576	CML 264	CML 269
CML 247	****							
CML 254	0.53	****						
R ₁	0.51	0.55	****					
CML 573	0.61	0.63	0.52	****				
CML 596	0.69	0.65	0.66	0.55	****			
CML 576	0.68	0.68	0.61	0.54	0.54	****		
CML 264	0.78	0.73	0.72	0.59	0.52	0.53	****	
CML 269	0.83	0.78	0.78	0.68	0.62	0.54	0.52	****

5.6 Análisis de conglomerado para características moleculares

El empleo de marcadores moleculares microsatélites en los programas de mejoramiento a corto plazo se utilizan para la identificación y discriminación de individuos, información sumamente necesaria en los estudios de identificación de los parentales de algunas poblaciones, control de cruzamientos, estudios de diversidad y distancia genética, así como para la identificación y protección de variedades patentadas (Yáñez, 2002).

Una población estructurada genéticamente es aquella en la que coexisten subgrupos o conglomerados de individuos que difieren sistemáticamente en sus frecuencias alélicas para los diferentes loci (Peña *et al.*, 2010).

La variabilidad fenotípica es uno de los obstáculos más grandes para el mejoramiento genético convencional. En los ensayos de campo siempre hay mucha variabilidad. La influencia predominante del ambiente representa un problema, ya que genotipos iguales en ambientes diferentes pueden tener fenotipos muy diferentes, mientras que genotipos diferentes en un mismo ambiente pueden tener fenotipos muy parecidos. Es decir, el factor del ambiente puede enmascarar a los factores genéticos (Gutiérrez *et al.*, 2016).

La figura 5 muestra el análisis de agrupamiento (dendrograma) de acuerdo a las distancias genéticas existente entre las 8 líneas, apreciándose la formación de tres grupos a partir de un valor fijo de 0.43. El análisis identificó tres grupos principales con el grado de similitud, resultando el menor coeficiente de distancia entre las líneas R₁ y CML 254 de 0.33 y el mayor

coeficiente de distancia en el que se agruparon varias líneas con 0.83, evidenciando alta diversidad genética y obteniendo un coeficiente de correlación confenética fue de 0.76 %.

En el primer grupo conformado por las líneas la CML 596 y la CML 576, mostrando similitudes genéticas y resultando correlacionadas a una distancia intermedia en el coeficiente de similitud de 0.58. En el segundo grupo las líneas la CML 269 y la CML 264 resultaron con similitud genética, pero no idénticas, estando correlacionada a una distancia del coeficiente de similitud de 0.44. El tercer grupo conformado por las líneas CML 573, R₁, CML 254 y CML 247 a una distancia del coeficiente de similitud de 0.49.

González *et al.*, (2012), en la caracterización molecular de líneas tropicales de maíz y su relación con los patrones heterocigóticos en encontró coeficientes de distancia en el rango comprendido entre 0.54 a 0.89 que resultaron muy similares a los encontrados en nuestro estudio; pero superaron a los rangos de coeficientes de distancia reportados por Hernández, *et al.*, (2010) en la caracterización de líneas parentales de híbridos de maíz en tres ambientes de Venezuela que fueron de 0.18 a 0.57 entre las líneas evaluadas.

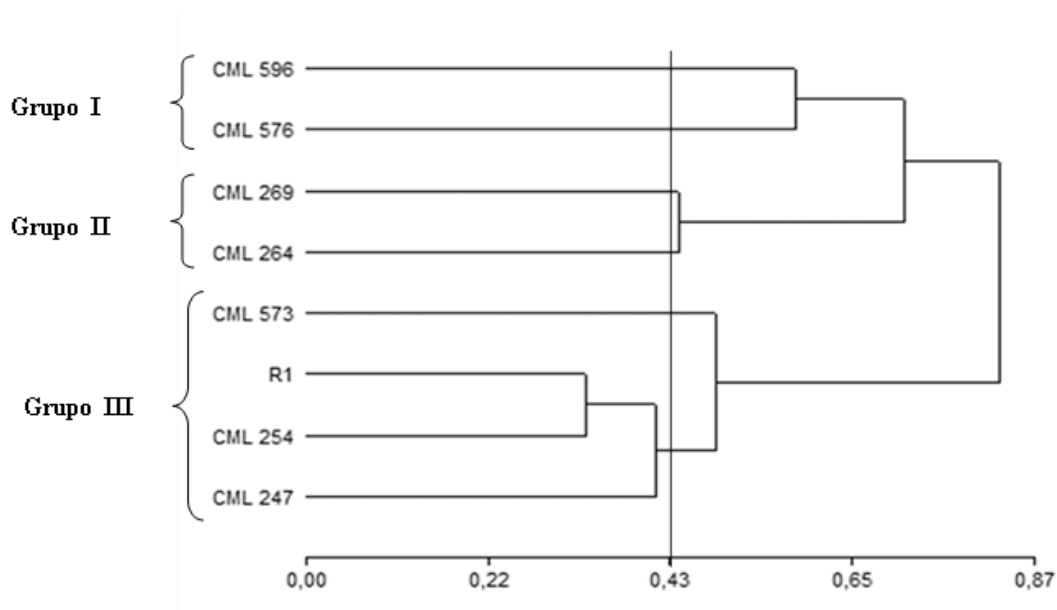


Figura 5. Dendrograma obtenido mediante el algoritmo de UPGMA de los coeficientes de distancia de Jaccard con datos obtenidos con 20 marcadores moleculares SSR en 8 líneas de maíz de datos marcadores.

VI. CONCLUSIONES

Los 20 locus microsatélites analizados detectaron un total de 80 alelos en las 8 líneas de maíz blanco y los loci que registraron mayor polimorfismo fueron el BNLG 197 con 6 alelos seguido de PHI 026, BNLG 1600, UMC 1845 y el BNLG 1272 con 5 alelos.

En las líneas que se identificaron mayores frecuencias alélicas fueron el CML 269, CML 247 y CML 596, y la línea que presentó menor frecuencia alélica fue CML 573.

Los marcadores con mayor valor de PIC fueron el BNLG 197, PHI 026 y BNLG 1600 con (0.754, 0.746 y 0.746 respectivamente). Por otro lado, los que menor PIC presentaron fueron BNLG 609 y PHI 057 (0.375 y 0.468, respectivamente); resultando una media del PIC en los 20 marcadores empleados en este estudio en 0.615.

Las líneas CML 247 y CML 269 que presentaron mayor distancia genética con valor de 0.83, mientras que la menor distancia genética se registró entre las líneas CML 247 con la R₁ con valor de 0.51.

El análisis de agrupamiento (dendrograma) de acuerdo a las distancias genéticas generó tres grupos de acuerdo a los coeficientes de distancia de Jaccard al a partir de un valor fijo de 0.43.

VII. RECOMENDACIONES

De acuerdo a información de la estructura genética de las ocho líneas, es posible formar híbridos simples entre ellas y entre estas con otras líneas no incluidas en el presente estudio para potenciar la heterosis y así obtener nuevos híbridos adaptados a las condiciones edafoclimáticas del país, así como de algunas enfermedades que afectan al cultivo de maíz.

Para iniciar la obtención de híbridos simples en base a la respuesta en su capacidad combinatoria específica (CCE) se pueden conformar los cruces entre líneas con textura de grano igual o parecida como se especifica a continuación: la línea CML 576 con textura del grano dentada cruzarlas con las líneas CML 247 y CML 254 que tienen textura de grano semi-dentada.

Otros cruces posibles entre líneas con textura de grano cristalina línea CML 596 con línea CML 264 y con la línea CML 269. La línea 596 con la línea R₁ que tiene textura del grano semi-cristalina.

VIII. LITERATURA CITADA

- Abebe, T; Tulu, L; Tesfu, K & Gebreselassie W. 2020. Genetic Variations in CIMMYT and Ethiopian Maize (*Zea mays* L.) Inbred Lines as Determined by Microsatellite Markers. *Ethiop. J. Agric. Sci.* 30(2) 31-53.
- Acosta, R. 2009. El cultivo del maíz, su origen y clasificación. *El maíz en Cuba Cultivos Tropicales*, vol. 30, núm. 2. Pp. 113-120. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas La Habana, Cuba.
- Alvarez, G. 2011. La selección asistida por marcadores (MAS, “Marker assisted selection”) en el mejoramiento genético del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Instituto Nacional de Ciencias agrícolas (INCA), Cuba: pp.154-169.
- Arguello, J. N. 2012. Caracterización molecular de 52 accesiones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) usando nueve marcadores tipo SSR, CNIAB-INTA. Nicaragua. 46 p.
- Arús, P., Cubero, J.I., García, J., Rallo, L. 2001. Marcadores moleculares en genética y mejora de plantas. En: *Introducción a la Biotecnología Vegetal. Métodos y Aplicaciones.* (eds) J. L. Caballero., V. Valpuesta y J. Muñoz. Córdoba, España: pp: 265-295.
- Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221-242.
- Balzarini M. Brono C. Peña A, Teich I, Di Rienzo J, A (2010). *Estadística en Biotecnología, Aplicaciones en Info-Gen Ed*, Grupo de Editores, Córdoba, Argentina.
- Bantte, K and B, M, Prasanna. 2003. Simple sequence repeat polymorphism in Quality Protein Maize (QPM) lines, *Euphytica* 129:337-344.
- Betrán F. J; Ribaut J. M, Beck D, González de León D. 2003. Genetic diversity, specific combining ability, and heterosis in tropical maize under stress and nonstress environments. *Crop Sci.* 43: 797-806.
- 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*, 33 (2): 129-144. Agosto. INTA, Argentina.
- Boto, L. 2017. Molecularizando la historia natural. *Revista de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM)* 194: 6-8
- Bracco, M. Caracterización genética del germoplasma de razas de maíz autóctonas provenientes del noreste argentino. 2012. Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. [Recuperado de http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5208](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5208) Bracco
- Caicedo, M; Ángel, L; Villavicencio, P; Saltos, E. 2017. Aptitud combinatoria general y específica de líneas puras de maíz amarillo duro y selección de híbridos simples. En: *Revista Científica Ecuatoriana*, Vol. 4. 18 p.

- Cardona, J. O. 2010. Análisis de diversidad genética de las razas colombianas de maíz a partir de datos Roberts et al. (1957) usando la estrategia Ward-MLM. *Cienci. Agro*, 2:199-207.
- Carrillo, T. C. 2009. El origen del maíz naturaleza y cultura en Mesoamérica. *Ciencias*, Núm. 92 – 93. Pp. 4-13. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Casalla, R. 2003. Medición de la distancia genética en grupos de camarón blanco *Liptopenaeus Vannamei* en la costa ecuatoriana. Tesis de maestría. Escuela Superior Politécnica del litoral, Guayaquil.
- Chapman, G P, y Peat, WE. 1995. Introducción a las gramíneas. Zaragoza: Editorial Acribia.
- CIMMYT. 1994. QTL data for populations Ki3 x CML139 and CML131 x CML67. In Goldman I, Rocheford T.R, Dudley J.W. 1993. Quantitative trait loci influencing protein and starch concentration in the Illinois long term selection maize strains. *Theor Appl Genet* 87(1-2):217-224
- CIMMYT. 2013. El CIMMYT lanza 22 líneas endogámicas o puras de maíz para el trópico y el subtropico. Recuperado el 15 de junio 2016. De <http://www.cimmyt.org/es/el-cimmyt-lanza-22-lineas-endogamicas-o-puras-de-maiz-para-el-tropico-y-el-subtropico>.
- Corcuera, V. R. 2012. Desarrollo y evaluación de nuevo germoplasma de maíz (*Zea mays* L.) para uso especial en Argentina. Tesis doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Medio Natural (ETSIAMN), Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España, 355 páginas.
- Cubero, J. I. 2013. Introducción a la Mejora Genética Vegetal (3.^a ed.). Madrid: Paraninfo /Mundi Prensa. Pp. 251-254.
- Dalla, M; Real, R. Vidal, S. 2003. Desarrollo y aplicación de marcadores codominantes para la determinación del sistema reproductivo en plantas. Editado por la Unidad de Agronegocios y Difusión del INIA. Montevideo, Uruguay. 39 p.
- De Vicente, M. C; López, C y T. Fulton. 2004. Tecnologías de Marcadores Moleculares para Estudios de Diversidad Genética de Plantas: Módulo de Aprendizaje. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) Roma, Italia.
- Doebley, J. F; M. M. Goodman & C. W. Stuber. 1985. Isozyme variation in the races of maize from Mexico. *Am. J. Bot.* 72(5):629-639.
- Di Betetti, M. 2000. The distribution of grooming among female primates: testing hypotheses with Shannon-Wiener diversity index. *Behaviour* 137 (11), 1517-1540.
- Espósito, M; Martin, E; Cravero, V; Cointry, E. 2011. Uso de marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares SRAP para diferenciar variedades de *Cynara cardunculus* L. (*Asteraceae*). *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Cuyo, Argentina.* 43 (2) 35-45.

- FAO. 2014. Perspectivas de cosechas y situación alimentaria. En: <http://www.fao.org/3/a-i3899s.pdf>.
- Ferreira, A. R. 2011. Diversidad genética de la colección de cultivares de peral del centro de investigaciones agrarias de Mabegondo. Escola Politécnica Superior Departamento de Producción Vexetal, Universidade de Santiago de Compostela, España. Tesis Doctoral. Pp. 228.
- Ferreira, M. E; Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1 ed. Brasilia, EMBRAPA-CENARGEN, documento 20. pp 220.
- Franco, T. L; Hidalgo R. 2003. Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico número. 8. Cali, Colombia: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). 89 p.
- Furnier, G. R. 1997. Métodos para medir variación genética en las plantas. In: Vargas, H. J. J, Bermejo, V.B., Ledig, F. T. Eds. Manejo de recursos genéticos forestales. USDA Forest Service, FAO, SEMARNAP. México. 22-29.
- Gale, M. D. 1994. Genetic markers, maps and wheat breeding. J. R. Agríc. Soc. Engl., 155:162-176.
- Galinat, W. C. 1992. Evolution of corn. *Advances in Agronomy*. 47:203-231.
- Galavic V.; S. Mladnovic D., J. Navalusić & M. Zlokolica. 2006. Characterization methods and fingerprinting of agronomically important crop species. *Genetika* 38 (2): 83-96.
- González, M. E. 2012. Análisis de diversidad genética interpoblacional e intrarracial utilizando marcadores SSR en maíces mexicanos. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, Coahuila, México. Pp. 119.
- González, L. M. 2009. Evolución del maíz (*Zea mays* L.). Hipótesis de heterocronía. En C. Cuevas y J.C. Gaytán (eds.). *Biología de la Conservación I. Sistemática y Biología Evolutiva*. Cátedra Nacional de Biología "Juan Luis Cifuentes Lemus" 2008. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y Consorcio de Universidades Mexicanas. Pachuca, Hidalgo, México. Pp. 51-58
- González, L; Hernández, A; Alezones, J. 2009. Caracterización molecular de líneas tropicales de maíz (*Zea mays* L.) y su relación con los patrones heteróticos. [Recuperado de Bioagro\[online\], vol.21, n.3, pp. 165-172. ISSN 1316-3361.](#)
- Griffon, D. 2008. Estimación de la Biodiversidad. En *Agroecología*. 3: 25-31.
- Gutiérrez, J.A; Ramírez, J.G; Raya, J. C; Covarrubias, J; Chablé, F; Aguirre, C. L. 2016. Variabilidad Genética de Líneas Endogámicas de Maíz Comparadas con Progenitores Criollos mediante Microsatélites *Conciencia Tecnológica*, núm. Instituto Tecnológico de Aguascalientes, México. 51, pp. 47-52.

- Hallauer A. R; M. Carena & J. B. Miranda F. 2010. Quantitative Genetics in Maize Breeding. Springer-Verlag. New York. 664 p.
- Hallauer, A. R., & J. B. Miranda Fo. 1988. Quantitative Genetics in Maize Breeding. 2nd ed. Iowa State Univ. Press/Ames. pp: 309-315
- Heredia-Díaz O; Alsirt A; Darrah L. L; Coe E. H. 1996. Allelic frequency changes in the MoScSSS maize synthetic in response to bi-directional recurrent selection for rind penetrometer resistance. *Maydica* 41: 65-76.
- Hernández – Ramos, M. A; Larramendi, L. A; Guevara, F; Rosales, María; Pinto, R; Ortiz, R. 2017. Caracterización molecular de maíces locales de la Reserva de la Biosfera. La Sepultura, México. *Agronomía Mesoamericana*. 28(1):69-83.
- Hernández, A. 2013. Caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. *Revista Bio-Ciencias*; 2(3). p. 113-118.
- Hernández, A; San Vicente, F; Figueroa R. 2010. Evaluación y caracterización de líneas parentales de híbridos de maíz (*Zea mays* L) en tres ambientes de Venezuela. *Interciencia*, apr, vol. 35 N° 4. Pág. 290-298.
- Hernández, A. 2007. Predicción de híbridos simples mediante marcadores SSR y RAPD. Tesis. Facultad de Agronomía, UCV. Maracay. 109 p.
- IICA. 2007. Mapeo de las cadenas agroalimentarias de maíz blanco y frijol en Centroamérica. IICA Proyecto Red SICTA. 132.
- IICA-Red SICTA. 2013. Estudio de las cadenas de valor maíz blanco y frijol en Centroamérica. 115 pp.
- Ivy, NA, Uddin, MS, Sultana, R. y Masud, MM (2007). DIVERGENCIA GENÉTICA EN MAÍZ (*Zea mays* L.). *Revista de Bangladesh sobre fitomejoramiento y genética* , 20 (1), 53-56. <https://doi.org/10.3329/bjpbg.v20i1.17027>
- Jimenez, O. R. 2009. Genetic purity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. ‘INTA Rojo’) during seed production in Nicaragua. Master’s Thesis. University of Helsinki, Finland.
- Junjian, Ni; Colowit, P; Mackill, D. J. 2002. Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers. *Crop Sci*. 42: 601-607.
- Kahler, A. L; Kahler J. L; Thompson, S. A; Ferriss R. S; Jones, E.S; Nelson, B. K; Mikel, M. A; Smith, S. 2010. North American study on essential derivation in maize II. Selection and evaluation of a panel of simple sequence repeat loci. *Crop Sci*. 50: 486-503.
- Kato, T.A; C. Mapes; L. M, Mera; Serratos, J. A; y Bye, R. A. 2009. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 116 pp. México, D.F.

- Kwak, M; Gepts, P. 2009 Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) Theor Appl Genet 118:979-992.
- Labate, J. A; Lamkey, K. R; Lee, M; Woodman, W. L. 2000. Hardy-Weinberg and linkage equilibrium estimates in the BSSS and BSCB1 random mated populations. Maydica 45: 243-255.
- Lacayo, J. M y Ponce, M. A. 2018. Evaluación molecular de tres generaciones, G0, G2, G3, del maíz criollo pujagua rojo, utilizando 15 cebadores microsatelitales tipo SSR, CNIA-INTA, Nicaragua. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria. 40 p.
- Londoño, J. M. 2011. Estructura poblacional y diversidad genética de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en 202 genotipos por medio de SSR fluorescentes. Tesis de grado. Universidad del Quindío, Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías. Programa de Biología. Armenia, Quindío, Colombia. 93.p.
- Loveless, Ad. D; Hamrick, J. L. 1984 Ecological determinants of genetic structure of plant populations. A. Rev. Ecol. Syst. 15, 65-95.
- Luo, S. G, B. Guanghong & Y. S. Wu. 2011. Identification of ISSR marker for main maize hybrid cultivars and their parents in Xinjiang. Сейфуллина 67(1):131-135.
- MAGFOR (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Forestal) 2012-2013, Informe Anual de ciclo agrícola. Nicaragua.
- Mathias, R. M; B. Sagredo, J. Kalazich. 2007. Uso de marcadores SSR para identificación de germoplasma de papa en el programa de mejoramiento de INIA de Chile. Agricultura Técnica (Chile) 67:3-15.
- Matsuoka, Y; Mitchell, S.E; Kresovich, S, Goodman, M; Doebley, J. 2002. Microsatellites in *Zea* variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. Theoretical and Applied Genetics., 104:436-450.
- Mbuya, K; K. K. Nkongolo; R. Narendrula, A. Kalonji-Mbuyi, and R.V. Kizungu. 2012. Development of quality protein maize (QPM) inbred lines and genetic diversity assessed with ISSR marker in a maize breeding program. Am. J. Exp. Agric. 2:626-640.
- Mohammadi, S. A; Prasanna, B.M. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants – Salient Statistical tools and considerations. Crop Science. 43:1235-1248.
- Morales, Y.M.L. 2002. Caracterización genotípica de plantas de maíz (*Zea mays* L.) utilizando secuencias microsatélites distribuidas uniformemente sobre el genoma. Tesis Lic., Universidad de Belgrado, Arg. Pp: 34.
- Morales, M; Decker, V; Leonardo Ornella, L. 2010. Analysis of genetic diversity in Argentinian heterotic maize populations using molecular markers, Cien. Inv. Agr. 37(1):151-160.

- Moreno-González, J. 1997. Marcadores moleculares en la mejora genética de plantas. Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo. La Coruña, España. [Recuperado de http://www.segenetica.es/docencia/marcmol.html](http://www.segenetica.es/docencia/marcmol.html).
- Murillo, A. 2010. Mapeo de regiones del genoma asociados con el contenido de β -caroteno en yuca. (*Manihot esculenta* Crantz). Tesis. Dr. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias. Palmira, Colombia. 254 p.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc natl acad scin USA. (70), 3321-3323.
- Nestares, G. E; E. Frutos, G. Eyherabide. 1999. Combining ability evaluation in orange flint lines of maize. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 34:1 399-1 406.
- Nuez, F. y Carrillo, J.M. 2000. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Onamu, R; Legaria, J. P; Sahagún, J; Rodríguez, J. L; Pérez, J. 2012. Marcadores morfológicos y moleculares en papa. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 35 (4).
- Ortiz, R; Taba, S; Chávez, V. H; Mezzalama, M; Xu, Y; Yan, J. Crouch, J. H. 2010. Conserving and enhancing maize genetic resources as global public goods—A perspective from CIMMYT. Crop Science, 50:13-28 (2010).
- Paliwal, R; Granados, G; Lafitte, H; Violic A; Marathée, P. 2001. El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Roma, Italia. [Recuperado de http://www.fao.org/docrep/003/X7650S/x7650s00.htm](http://www.fao.org/docrep/003/X7650S/x7650s00.htm)
- Pardo, E; Jiménez, M; Cavadía, T. 2017. Genetic diversity in a population of creole maize (*Zea mays* L.) evaluated using microsatellite markers in Tierralta, Córdoba-Colombia. Revista Bistua. 15(2):96-107.
- Paterniani, E. 1990. Maize breeding in the tropics. CRC Crit. Rev. Plant Sci. 9:125-154.
- Peakall, R.Y; Smouse, P.E. 2006. Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and reseaech. Molecular Ecology (6), 288.295.
- Pejic I. Ajmone-Marsan P. Morgante M. Kozumplick V. Castiglioni P. Taramino G. Motto M., 1998. Comparative analysis of genetic similarity among inbred maize lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. Theor Appl Genet 97: 1248-1255.
- Peña, A; Bruno, C; Teich, I; Fernández, E; Balzarini, M. 2010. Análisis de conglomerados en la identificación de estructura genética a partir de datos de marcadores moleculares. Revista Tumbaga, Córdoba, Argentina. Págs. 225-237.

- Pérez, D. M. 2013. Caracterización molecular y análisis de diversidad genética en variedades de pimiento autóctonas de Galicia. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología. Universidad de Coruña, España. 46 p.
- Plan Nacional de Producción, Consumo y Comercio 2020-2021. 47 p.
- Rojas, R. 2015. Evaluación de la diversidad genética en las razas criollas e indígenas de maíz en Colombia mediante marcadores moleculares tipo RAMs. Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional de Colombia, Colombia. 93p.
- Sánchez Vanesa, J. M; López, A.I.; Villegas, J; Montaña, A. N. 2014. Respuesta del maíz (*Zea mays* L) a la inoculación con *Azotobacter sp* y *Burkholderia sp* a dosis reducida de fertilizante nitrogenado. Scientia Agropecuaria, vol. 5, núm. 1, pp. 17-23. Universidad Nacional de Trujillo Trujillo, Perú.
- San Vicente, F. 2007. Desafíos y avances en el desarrollo de híbridos simples de maíz en Venezuela. XIII curso sobre producción de maíz. ASOPORTUGUESA, Araure, estado Portuguesa.
- Sax, K. 1923. The association of size differences with tation in *phaseolus vulgaris*. Maine Agricultural Experiment Station, Orono, Maine. Genetics 8:552-560. [Recuperado de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1200765/pdf/552.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1200765/pdf/552.pdf).
- Sequeira, M; Jurema, R; Queiroz, E; Borges, B; Kayo, J; y Pereira, J. 2009. Genetic characterization of cassava (*Manihot esculenta*) landraces in Brazil assessed with simple sequence repeats.
- Serratos, J. A. 2009. El origen y la diversidad del maíz en el continente americano. Universidad Autónoma de la Ciudad de México para Greenpeace México. 33p.
- Silva, W. R; Alfaro, Y. J; Jiménez, R. J. 2009. Evaluación de las características morfológicas y agronómicas de cinco líneas de maíz amarillo en diferentes fechas de siembra. Revista UDO Agrícola 9 (4): 743-755.
- Solís, L; Andrade, A. 2005. ¿Qué son los marcadores moleculares? La Ciencia y el Hombre, vol. XVIII (1): 41-46. [Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/279670229_Que_son_los_marcadores_moleculares](https://www.researchgate.net/publication/279670229_Que_son_los_marcadores_moleculares).
- Suslow, T. V; B. R. Thomas; K. J. Bradford. 2005. Biotechnology provides new tools for plant breeding. Agric. Biotechnol. California Series. Publication 8043. pp: 1-19.
- Tiessen, A. 2012. Fundamento de mejoramiento genético vegetal. Madrid, España: Editorial académica española.
- Torrez M.E, Moreno S. 2001. Caracterización mediante marcadores moleculares basados en ADN. En F González – Andrés, J Pita Villamil, eds, Conservación y caracterización de

- recursos fitogenéticos, 1ed. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola I.N.E.A., Valladolid – España, pp 235 – 253.
- Vasal, S. K; G, Srinivasan; H. S. Córdova; S. Pandey; D. Jeffers; D. Bergvinson; D. Beck. 1999. Inbred line evaluation 9 nurseries and their role in maize breeding at CIMMYT. *Maydica*. 44:341-351.
- Vaz Patto, M. C; Moreira, P. M; Almeida, N; Satovic, Z; Pego, S. 2008. Genetic diversity evolution through participatory maize breeding in Portugal. *Euphytica* 161: 283291.
- Weir, B; Cockerham, C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. (38): 1358-1370.
- Xia, X. C; Reif, J. C; Hoisington, D. A; Melchinger, A. E; Frisch, M; Warburton, M. L. 2004. Genetic diversity among CIMMYT maize inbred lines investigated with SSR markers: I. Lowland tropical maize. *Crop Sci*. 44:2230-2237.
- Yáñez, V.O. 2002. Aislamiento y Caracterización de Marcadores Moleculares Microsatélites a partir de la Construcción de Librerías Genómicas Enriquecidas de Camote (*Ipomoea batatas* (L.)), Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo con Mención en Genética, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, 108 p.
- Zaldivar, M; Rocha, O. 2006. Diversidad genética y variación en la viabilidad de plantas cultivadas en sistemas agrícolas. (Tesis de Pregrado). Universidad de Costa Rica, Costa Rica. 23 P
- Zane, L; Bargelloni, L; Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* (11): pp 1-16.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de soluciones que se usaron en la extracción de ADN

a. Buffer de extracción de ADN

Reactivos	Cantidad
1M, Tris-HCL	0.1ml
3M, NACL	0.5ml
0.5M, EDTA	0.05ml
3 M, KAC	5.88 g
SDS	10 ml
100% B-mecoptoethanol	0.02m

Todos los reactivos se disuelven con agua destilada hasta completar un volumen de 100 ml. El volumen que se preparo fue de 100 ml. Luego se coloca en autoclave.

b. Tris 1 Molar

Reactivos	Cantidad
Hidroxymethyl Aminomethenl Hydrochloride	157.60 g
H2O	20 ml

Se agregó HCL para fijar el PH a 8. El volumen que se preparo fue de 100 ml.

Cloruro de Sodio 3 Mol

Reactivos	Cantidad
NACL	175.32 g
H2O destilada	20 ml

La solución se debe completar con agua destilada hasta alcanzar el volumen de 100 ml. Luego se coloca en autoclave.

c. Buffer EDTA 0.5 Mol.

Reactivos	Cantidad
Ethylenediaminetetracetic Ácido Dissodium Saltdiol	146.12 g
H2O destilada	20 ml

La solución se debe completar con agua destilada hasta alcanzar el volumen de 1 litro. Luego se coloca en autoclave.

d. Acetato de potasio 3 Mol.

Reactivos	Cantidad
KAC	294.42 g
H2O destilada	20 ml

La solución se completó con agua destilada hasta alcanzar el volumen de 100 ml. Llevar a autoclave. Agregar de forma variable HCL hasta llegar al PH deseado de 5.2.

e. Dodecilsulfato de sodio 0.5 Mol.

Reactivos	Cantidad
SDS	1 g
H2O destilada	10 ml

La solución se debe rellenar con agua destilada hasta alcanzar el volumen de 100 ml.

f. Solución madre TBE 10X

Reactivos	Cantidad
EDTA	9.3 g
Ácido Bórico	55 g
Tris Base	108 g

Diluir en 1000 ml de agua esterilizada. Para llevar la solución al 1X, del Stock original mezclar 100 ml con 900 ml de agua esterilizada.

g. Buffer TE

Reactivos	Cantidad
Tris HCL	10 m
EDTA	0.1 m
RNASC	4 µl

h. Stock de Marcadores Moleculares.

Reactivos	Cantidad
100 pico M Marcador Forward	20 µl
100 pico M Marcador Reverse	20 µl
1X TE	380 µl

Preparación: En un tubo eppendorf de 1.5 ml se colocó 20 µl, del marcador Forward (F) más 380 de TE al 1X, para obtener una 400 µl, y para el marcador Reverse (R), se realiza el mismo procedimiento, donde se obtuvo dos tubos de stock de cada uno de los marcadores F Y R, en concentraciones de 5 pico mol.

Anexo 2. Protocolos amplificación de ADN, para correr muestras de maíz en PCR

a. Marcadores: BNLG 1272 y PHI 96100

Solución Stock 20 µl x 11 muestras			Programa Electroforesis
Productos	Cant. (µl)	Total (µl)	
Master Mix	12	122	Gel Agarosa Metaphor 1% 120 minutos 90 voltios 330 amperios Teñir 6x (4µl x muestra)
Forward	2	22	
Reverse	2	22	
Agua libre	3	33	
ADN/muestra	1		

- b. Marcadores: BNLG 127, BNLG 1176, PHI 112, PHI 119, BNLG 1169, BNLG 197, BNLG 609, UMC1073, BNLG 1600, UMC 1645, PHI 026, UMC 1792, PHI 057, BNLG 400, P-UMC 1304, PHI 063, UMC 1845 y NC 013.

Solución Stock 20 µl x 11 muestras			Programa Electroforesis
Productos	Cant. (µl)	Total (µl)	
Master Mix	10	110	Gel Agarosa Metaphor 1% 120 minutos 90 voltios 330 amperios Teñir 6x (4µl x muestra) Ladder 100-1000 pb 4µl
Forward	2	22	
Reverse	2	22	
Agua libre	5	55	
ADN/muestra	1		

Anexo 3. Protocolos de 20 marcadores, optimizados para PCR en las 8 líneas de maíz 2018.

Marcadores BNLG 1272, PHI 96100

Programa PCR Gradiente 50.2 – 59.5 °C	Solución Stock 20 µl x 11 muestras			Programa Electroforesis
	Productos	Cant. (µl)	Total (µl)	
94°C ----- 5 minutos	Master Mix	12	122	Gel Agarosa Metaphor 1% 120 minutos 90 voltios 330 amperios Teñir 6x (4µl x muestra) Ladder 100-1000 pb 4µl
94°C ----- 1 minuto	Forward	2	22	
54°C -----1 minuto	Reverse	2	22	
72°C----- 1 minuto	Agua libre	3	33	
72°C-----10 minutos	ADN/muestra	1		
-4° c ----- Conservación				

Marcador BNLG 127, BNLG 1176, PHI 112, PHI 119, BNLG 1169, BNLG 197, BNLG 609, UMC1073, BNLG 1600, UMC 1645, PHI 026, UMC 1792, PHI 057

Programa PCR Gradiente 50.2-59.5°C	Solución Stock 20 µl x 11 muestras			Programa Electroforesis
	Productos	Cant. (µl)	Total (µl)	
94°C ----- 5 minutos	Master Mix	10	110	Gel Agarosa Metaphor 1% 120 minutos 90 voltios 330 amperios Teñir 6x (4µl x muestra) Ladder 100-1000 pb 4µl
94°C ----- 1 minuto	Forward	2	22	
50°C -----1 minuto	Reverse	2	22	
72°C----- 1 minuto	Agua libre	5	55	
72°C-----10 minutos	ADN/muestra	1		
-4° c ----- Conservación				

Marcadores BNLG 400, P-UMC 1304, PHI 063, UMC 1845, NC 013

Programa PCR Gradiente 55.2-64.6°C	Solución Stock 20 µl x 11 muestras			Programa Electroforesis
	Productos	Cant. (µl)	Total (µl)	
94°C ----- 5 minutos	Master Mix	10	110	Gel Agarosa Metaphor 1% 120 minutos 90 voltios 330 amperios Teñir 6x (4µl x muestra) Ladder 100-1000 pb 4µl
94°C ----- 1 minuto	Forward	2	22	
59°C -----1 minuto	Reverse	2	22	
72°C----- 1 minuto	Agua libre	5	55	
72°C----10 minutos	ADN/muestra	1		
-4° c ----- Conservación				

Anexo 4. Procedimiento y dosis para preparar Gel de Agarosa metaphor PCR 1%

Reactivos	Cantidad
Agarosa Metaphor	1 g
TBE 0.5X	100 ml
Bromuro de Etidio	4 µl

Preparación: En un beaker depositar 100 µl de TBE 0.5X y agregar 1 gramos de Agarosa Metaphor, dejar calentar por un periodo aproximado de 2 – 2.5 minutos en horno de microondas hasta lograr un color transparente de la mezcla sin presencia de grumos, dejar enfriar hasta lograr una temperatura aproximada de 38°C para aplicar 4 µl de bromuro de etidio se agita para homogeneizar la mezcla y se vierte en carcasas con capacidad de 100 ml, introducir una peineta de 20 espaciadores de 1 mm, dejar solidificar la mezcla durante 20 minutos. Este gel fue usado para correr ADN producto PCR.

Anexo 5. Fotografías en la realización del estudio.

