

Universidad Autónoma de Sinaloa
Colegio en Ciencias Agropecuarias
Maestría en Ciencias Agropecuarias



TESIS:

**“CARACTERIZACIÓN AGROMORFOLÓGICA Y GENOTÍPICA DE POBLACIONES
DE LA RAZA DE MAÍZ CHAPALOTE”**

**Que para obtener el grado de Maestra en Ciencias
Agropecuarias**

PRESENTA:

Guadalupe Valdez Velázquez

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Pedro Sánchez Peña

CODIRECTOR DE TESIS:

Dr. Cesar Daniel Petroli

Culiacán, Sinaloa, México; a Septiembre de 2022

Universidad Autónoma de Sinaloa

Colegio en Ciencias Agropecuarias Maestría en Ciencias Agropecuarias



TESIS:

**“CARACTERIZACIÓN AGROMORFOLÓGICA Y GENOTÍPICA DE POBLACIONES
DE LA RAZA DE MAÍZ CHAPALOTE”**

**Que para obtener el grado de Maestra en Ciencias
Agropecuarias**

PRESENTA:

Guadalupe Valdez Velázquez

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Pedro Sánchez Peña

CODIRECTOR DE TESIS:

Dr. Cesar Daniel Petroli

Culiacán, Sinaloa, México; a Septiembre de 2022

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **GUADALUPE VALDEZ VELÁZQUEZ**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR _____
Dr. Pedro Sánchez Peña

CODIRECTOR _____
Dr. César Daniel Petrolí

ASESORA _____
Dra. Soila Gaxiola

ASESORA _____
MCs. Valeria Gómez Pérez

Culiacán, Sinaloa, México; a 19 de septiembre de 2022

DEDICATORIA

Dedicado a mi familia, por acompañarme en cada uno de mis proyectos y estar para mí de manera incondicional, este logro es por y para ellos.

También me gustaría agradecer al comité nacional de ciencia y tecnología CONACYT, por el apoyo económico brindado durante este periodo.

Así como agradecer profundamente a mis asesores, por cada orientación, cada consejo y cada palabra de aliento brindada para poder llevar a cabo este proyecto de manera satisfactoria.

ÍNDICE

Índice de tablas.....	VII
Índice de figuras.....	VII
Resumen.....	VIII
Abstract.....	IX
INTRODUCCIÓN	8
II. ANTECEDENTES.....	10
2.1 Generalidades del maíz.....	10
2.2 Importancia del maíz en México	11
2.3 El Ancestro común de las razas de maíz y su variación genética	12
2. 4 Clasificación racial del maíz.....	13
2.5 Características de las poblaciones del grupo racial Chapalote.....	14
2.5.1 Características de la raza Chapalote.....	16
2.6 Importancia de la diversidad genética del maíz	17
2. 6. 1 Caracterización de la diversidad del maíz.....	17
2. 7 Métodos Moleculares para la identificación de germoplasmas.....	19
2.7.1 Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP).....	19
2.7.2 Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPDs).....	20
2.7.3 Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP).....	22
2.7.4 Microsatélites o Repeticiones de Secuencias Simples (SSR).....	23
2.7.5 Secuenciación de Nueva Generación (NGS).....	24
2. 7.6 Plataforma DArTseq	26
III. HIPÓTESIS	29
IV. OBJETIVOS.....	30
4.1 Objetivo general.....	30
4. 2 Objetivos específicos	30
4. 2. 1 Caracterización agromorfológica las poblaciones de Chapalote obtenidas	30
4.2.2 Caracterización genotípica	30
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
5.1 Fuente de Germoplasma.	31

5.2 Localización del experimento para caracterización agromorfológica.	32
5. 3 Caracterización agromorfológica.	33
5.3.1 Variables evaluadas.	33
5.3.2 Variables vegetativas.	33
5.3.3. Variables de espiga.	34
5.3.4. Variables de mazorca.	34
5.3.5. Variables de grano.	35
5.4 Caracterización Genética.	35
5.4.1 Obtención de DNA genómico.	35
5.4.2 Reducción de la complejidad genómica.	36
5.4.3 Amplificación de fragmentos.	37
5.4.4 Purificación y cuantificación.	38
5. 4. 5 Secuenciación.	39
VI. RESULTADOS	40
Análisis de conglomerados de datos agromorfológicos.	47
Control de calidad y selección de los marcadores	48
Análisis de conglomerados	50
VII. DISCUSIONES	54
VIII. CONCLUSIONES	57
Bibliografía	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Información de pasaporte de las poblaciones de Chapalote del Banco de Germoplasma del CIMMYT.....	32
Tabla 2: Resultado del cuadrado medio de los efectos.....	42
Tabla 3: Número de marcadores tipo SNPs.....	49
Tabla 4: Análisis de varianza molecular (AMOVA).....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Taxonomía del maíz.....	10
Figura 2: Comparación entre la planta de Teocintle y Maíz actual.....	12
Figura 3: Algunas razas de maíz reportadas en México	14
Figura 4: Mazorcas de los maíces pertenecientes al grupo de los Chapalotes.....	15
Figura 5: Plataforma de genotipificación de alto rendimiento DArTseq	28
Figura 6 Mapa del estado de Sinaloa.....	32
Figura 7: Demostración de los espacios que cubre cada variable vegetativa.....	34
Figura 8: Colecta de mazorcas de cada población.....	40
Figura 9: Comparación de medias de las variables vegetativas	43
Figura 10: Comparación de medias de las variables de espiga	44
Figura 11: Comparación de medias de las variables de mazorca	45
Figura 12: Comparación de medias de las variables de grano.....	46

Figura 13: Comparación de medias de la variable rendimiento de grano.....	46
Figura 14: Dendograma fenotípico de las poblaciones analizadas.....	48
Figura 15: Distribución de frecuencia del contenido de información de polimórfica.....	50
Figura 16: Dendograma jerárquico de las relaciones entre las 18 poblaciones.....	51
Figura 17: Análisis de correlación entre distancias genéticas y fenotípicas.....	53

RESUMEN

Caracterización Agromorfológica y Genotípica de Poblaciones de Maíz Chapalote

Los maíces nativos han sido el sustento de miles de familias rurales en México por siglos. Chapalote es una de las razas locales más representativas del norte de México, la cual se distribuye principalmente en zonas bajas del noroeste de México, en los estados de Sinaloa y Sonora. A pesar de su valor como base alimenticia y cultural de toda esta región, Chapalote es una variedad poco estudiada, por lo que la evaluación de su diversidad genética es necesaria, ya que en ella se podrían encontrar alternativas alélicas que nos conducirían al desarrollo de estrategias de caracterización, conservación, y uso del germoplasma en el mejoramiento genético, dado su potencial como fuente de características nuevas, exóticas y favorables. En este estudio se caracterizaron 18 poblaciones registradas en el Banco de Germoplasma del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) como pertenecientes a la raza Chapalote. En los resultados pudimos observar que 12 de las 18 poblaciones analizadas cumplían estrictamente con las características agromorfológicas propias de esta raza de maíz nativo. Otra observación que nos deja el estudio realizado es que la raza Chapalote se presenta como una de las razas más resistentes y con mayor porcentaje de adaptabilidad para su germinación, lo que lo vuelve una raza interesante para proyectos de premejoramiento, puesto que en ella podemos explorar características de importancia agronómica que nos ayudarían a generar germoplasma con mayor adaptabilidad, lo que posibilitaría un aumento en su utilización y con ello conservar el acervo genético disponible y necesario en los maíces del Estado de Sinaloa.

Palabras claves: Maíces nativos, Chapalote, caracterización, diversidad genética.

Abstract

Agromorphological and Genotypic Characterization of the Chapalote Maize Populations

Native maize has been the livelihood of thousands of rural families in Mexico for centuries. Chapalote is one of the most representative local breeds of northern Mexico, which is distributed mainly in lowland areas of northwestern Mexico, in the states of Sinaloa and Sonora. Despite its value as a food and cultural base for this entire region, Chapalote is a little studied variety, so the evaluation of its genetic diversity is necessary, since allelic alternatives could be found in it that would lead us to the development of strategies of characterization, conservation, and use of germplasm in genetic improvement, given its potential as a source of new, exotic and favorable characteristics. In this study, 18 populations registered in the Germplasm Bank of the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) were characterized as belonging to the Chapalote breed. In the results we were able to observe that 12 of the 18 analyzed populations strictly complied with the agromorphological characteristics of this native maize race. Another observation that the study carried out leaves us is that the Chapalote breed is presented as one of the most resistant breeds and with the highest percentage of adaptability for its germination, which makes it an interesting breed for pre-breeding projects, since in it we can explore characteristics of agronomic importance that would help us to generate germplasm with greater adaptability, which would allow an increase in its use and thus conserve the available and necessary gene pool in the maize of the State of Sinaloa.

Keywords: Native maize, Chapalote, characterization, genetic diversity.

INTRODUCCIÓN

Hace aproximadamente 10,000 años, en algún lugar de Mesoamérica, los indígenas colectaron a los ancestros del maíz sin conocer el impacto que este grano tendría en el futuro de la humanidad. El cultivo del maíz, y otras plantas originarias de América gradualmente transformaron al hombre de nómada en sedentario. Los primeros agricultores seleccionaron y manipularon al maíz, y a través de varios siglos lo transformaron en una amplia gama de poblaciones autóctonas. Inmediatamente el maíz se posicionó como el cultivo más importante y el centro del desarrollo de las culturas mesoamericanas (Preciado Ortiz, 2011).

México es considerado el centro de origen de la diversidad del maíz, dicha variabilidad está presente en las milpas de los agricultores en todas las regiones productoras. Este cultivo se siembra desde el nivel del mar hasta los 2700 m de altitud; de los casi 14, hasta los 32° latitud norte, de 87° hasta los 117° longitud oeste del meridiano de Greenwich; en las zonas áridas, y hasta casi 3000 milímetros de precipitación anuales en el suroeste, con temperaturas medias que van de los 13 a 15° durante el ciclo de cultivo en valles altos, y a 27° en promedio en el trópico; con poca luminosidad y alta humedad relativa en la sierra Tarasca o altas temperaturas de verano (25° a 32°) y muy baja humedad relativa en el norte (Luna, 1993).

Durante cientos de años los pueblos autóctonos de México han desarrollado una relación cultural íntima con la naturaleza, como se puede comprobar en las diversas manifestaciones pluriétnicas del país, en donde el maíz ha sido parte fundamental en esta convivencia. La mayoría de las comunidades de nuestro país tienen una relación directa con la diversidad del maíz caso específico de la milpa (cultivos mixtos de variedades locales), resultado de años de selección y en muchos casos de franca domesticación. (Bye Boettler, 2009).

El cultivo de maíz se popularizó tanto que desde la época de los aztecas se reconocen muchos tipos de maíz con diferentes aplicaciones, los cuales varían en tamaño de grano, textura, pigmentación o color y aplicación culinaria. (Preciado Ortiz, 2011).

La diversidad genética del maíz a través de un proceso evolutivo continuo, que involucra la selección consiente e inconsciente del hombre, como del ambiente y el flujo genético, ha permitido la adaptación del maíz a todos los sistemas de producción que se realizan en las diversas condiciones ambientales. Además, esta variabilidad constituye una riqueza biológica muy importante para las generaciones actuales y futuras del mundo y puede ser la base para lograr la seguridad alimentaria de México (Preciado Ortiz, 2011).

La domesticación del maíz dio lugar a un grupo de razas ancestrales que eventualmente se diversificaron y se adaptaron a una amplia gama de condiciones climáticas y geográficas. Si bien los biólogos no siempre coinciden en el número total de variedades locales o nativas existentes actualmente en México, hay al menos 59 de ellas que pueden distinguirse clara y consistentemente en base a características bioquímicas y morfológicas (Ortega, 2011).

Los maíces nativos son poblaciones heterogéneas, que presentan un alto número de combinaciones alélicas, y por ello se presentan como una valiosa fuente natural de diversidad genética y representan un banco insustituible de recursos genéticos (Ortega, 2011). La amplia variación genética de estas variedades ha sido aprovechada en contados programas de mejoramiento genético, permitiendo obtener germoplasma mejorado y adaptado a numerosos ambientes (Esquivel, 2011).

Sin embargo, debido al gran número de poblaciones nativas existentes, estas no se han evaluado en su totalidad, y por consiguiente se desconoce la relación genética que pueda existir entre ellas (Vigouroux Y, 2002). El incremento de la base genética del maíz es una meta importante en los programas de mejoramiento genético, proceso en los que el uso de germoplasma nativo podría tener gran potencial (Radović, 2000). La evaluación del germoplasma nativo es necesaria para conocer y determinar su valor agronómico, además de permitir la formación de grupos con poblaciones morfológicamente similares, lo que facilita mantener y eventualmente mejorar características de interés agronómico (Vielle-Calzada, 2009).

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del maíz.

Con base en evidencias arqueológicas y el estudio de fósiles, se ha comprobado que el maíz es originario del continente americano, específicamente de México, restos arqueobotánicos de maíz han sido descubiertos en cuevas del Valle de Tehuacán, con una antigüedad entre 4500 a 7000 años; en la cueva de Guilá Naquitz en los valles centrales de Oaxaca con una antigüedad de 6200 años aproximadamente (Hugh, 2000). En la Ciudad de México en excavaciones a 80 m de profundidad hallaron fósiles de polen de maíz de unos 80,000 años. Además, en la Cueva del Murciélago, Estado de Nuevo México, se encontraron fósiles de mazorcas pequeñas de unos 5,600 años; considerándose que esta es la edad del cultivo del maíz (Galinat, 1995).

El nombre del maíz proviene de las Antillas, pero en México, los nahuas lo denominaron *centli* (a la mazorca) y *tlaoilli* (al grano). Este cultivo, taxonómicamente pertenece al reino Plantae, subclase monocotiledónea, a la familia de las gramíneas (Poaceae), género *Zea* y especie *mays*, Tal como se describe en la imagen (figura 1).



Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Liliopsida
Orden: Poales
Familia: Poaceae
Género: *Zea*
Especie: *Zea mays*

Nombre binomial
Zea mays
L.

Figura 1: Taxonomía del maíz.

2.2 Importancia del maíz en México

En México, centro de origen, domesticación y diversificación del maíz (*Zea mays* L.), existen aproximadamente 59 razas de acuerdo con la clasificación más reciente basada en características agromorfológicas e isoenzimáticas (Sánchez-Goodman, 2000), que representan un significativo porcentaje de las 220 a 300 razas de maíz existentes en el continente americano (Kato, 2009). Esta diversidad también es producto de milenarias prácticas agrícolas vinculadas al conocimiento tradicional de los pueblos indígenas de México, principales herederos, custodios y mejoradores del germoplasma nativo (Mera-Ovando, 2009), (Turrent-Fernández, 2012), (Toledo-Manzur, 2008). Inclusive, el mejoramiento genético del maíz es una actividad que en México probablemente se remonta a más de 10 mil años (Miranda-Colín, 2000).

Desde el punto de vista alimentario, político, económico y social, el maíz es el cultivo más importante del país (SIAP., 2012). Basta con decir que el consumo per cápita de maíz en México es aproximadamente 10 veces mayor que el de Estados Unidos de América (Serna-Saldívar, 2008). Este cereal cubre poco más de la tercera parte de la superficie agrícola sembrada, basta decir, que, en 2017, fueron sembradas 8,148,008.60 ha, con maíz (forrajero, grano, palomero y semilla) y a pesar de que se cosecharon 27,762,480.90 toneladas, existe un déficit promedio de 10 millones de toneladas de maíz para cubrir el requerimiento nacional (SIAP, 2019). De la superficie total sembrada con maíz, la mayor es de temporal o seco (SIAP., 2012), a cargo fundamentalmente de más de 2 millones de productores a pequeña escala, quienes lo siembran sobre todo para autoconsumo (Mera-Ovando, 2009).

Más de la mitad de la producción nacional de maíz proviene de este sistema (Turrent-Fernández, 2012), el cual también es conocido como de subsistencia porque contribuye significativamente a la seguridad alimentaria de los estratos rurales más pobres (Turrent-Fernández, 2012). Es aquí en donde los maíces nativos se seleccionan, producen, conservan, diversifican y domestican de acuerdo con las necesidades de las poblaciones locales (Turrent, 2010), (Turrent-Fernández, 2012).

2.3 El Ancestro común de las razas de maíz y su variación genética

El maíz fue domesticado a partir del teocintle (figura 2), hace casi 9000 años en México (Doebley, 1990), (Kato, 2009). La domesticación redujo la diversidad de la especie, en relación con el teocintle (Vigouroux, 2008). La variación en poblaciones de maíz domesticado ha sido reducida o reestructurada por fenómenos de deriva genética y selección, tanto la natural como la artificial. Como resultado, en la actualidad se encuentra un gran número de poblaciones nativas adaptadas a condiciones ambientales específicas y adecuadas a una amplia diversidad de usos (Warburton, 2008). Los criterios predominantes para definir e identificar razas del complejo genético de *Zea mays* L. se basan en los mencionados atributos morfológicos, agronómicos y de distribución geográfica. En algunas ocasiones estos presentan inconsistencias de la auténtica identidad genética de las poblaciones (Ortega-Guerrero, 2013).



Figura 2. Comparación entre la planta de Teocintle y Maíz actual.

Las poblaciones nativas han sido la base para el desarrollo de las variedades modernas de polinización libre y de híbridos en todo el mundo, aunque las poblaciones nativas que no han sido usadas como fuente para mejorar germoplasma de maíz podrían contener alelos útiles aún sin explotar. Las colecciones de germoplasma juegan un papel importante en el mejoramiento genético; deben ser caracterizadas para su manejo y aprovechamiento eficiente como fuente de diversidad genética, para enfrentar los riesgos debidos a nuevos parásitos, insectos y estrés ambiental (Reif, 2004), (Smith, 2007), como temperatura alta o estrés hídrico.

El incremento en la tasa de erosión de las poblaciones nativas hace que la colección del germoplasma en peligro de extinción sea extremadamente urgente, especialmente en los centros de origen y áreas de diversidad (Damania, 2008). Los recursos genéticos nativos deben ser colectados para su conservación, caracterización y aprovechamiento en diversos usos actuales y futuros, para mantener una amplia base de genes para utilizarlos en el mejoramiento genético y prevenir pérdidas permanentes de la diversidad restante y la extinción de parientes silvestres (Castro-Nava, 2011).

2. 4 Clasificación racial del maíz

El término raza se ha utilizado en el maíz y en las plantas cultivadas para agrupar individuos o poblaciones que comparten características en común, de orden morfológico, ecológico, genético y de historia de cultivo, que permiten diferenciarlas como grupo (Cutler-Anderson, 1942). Con este criterio fue que las diversas colectas de maíz realizadas en diferentes partes del mundo fueron clasificadas como razas, Wellhausen (1951) cita en 11 documentos que describen las razas presentes en los distintos países de Latinoamérica, el autor comenta que para esa época ya se habían descrito alrededor de 300 razas de maíz aproximadamente.

Históricamente el maíz ha desempeñado un papel primordial en el desarrollo de la humanidad. Su importancia en los albores de la civilización Mesoamericana fue más allá de su alimentación ya que formó parte fundamental en las prácticas religiosas, de literatura y enseñanzas. La supervivencia del maíz hasta nuestros días se debe a la curiosidad, inteligencia e iniciativa de los pueblos antiguos mexicanos. Algunos estudios consideran que existen por lo menos 59 razas de maíces mexicanos, (estas pueden ser observadas en la Figura 3) (Sánchez-Goodman, 2000) en las que hay distintas variedades.

En el noroeste de México y concretamente en la región de la sierra de los estados de Sonora y Sinaloa, aún persisten las diez razas de maíz identificadas a mediados de la década de los cuarenta (Wellhausen, 1951), como Blando de Sonora, Chapalote, Dulcillo del Noroeste, Harinoso de ocho, Onaveño, Reventador, Tabloncillo, Tabloncillo

Perla, Tuxpeño y Vandeño. Tanto las primeras exploraciones como las actuales, muestran que las dos razas con mayor distribución son: Tabloncillo y Reventador.

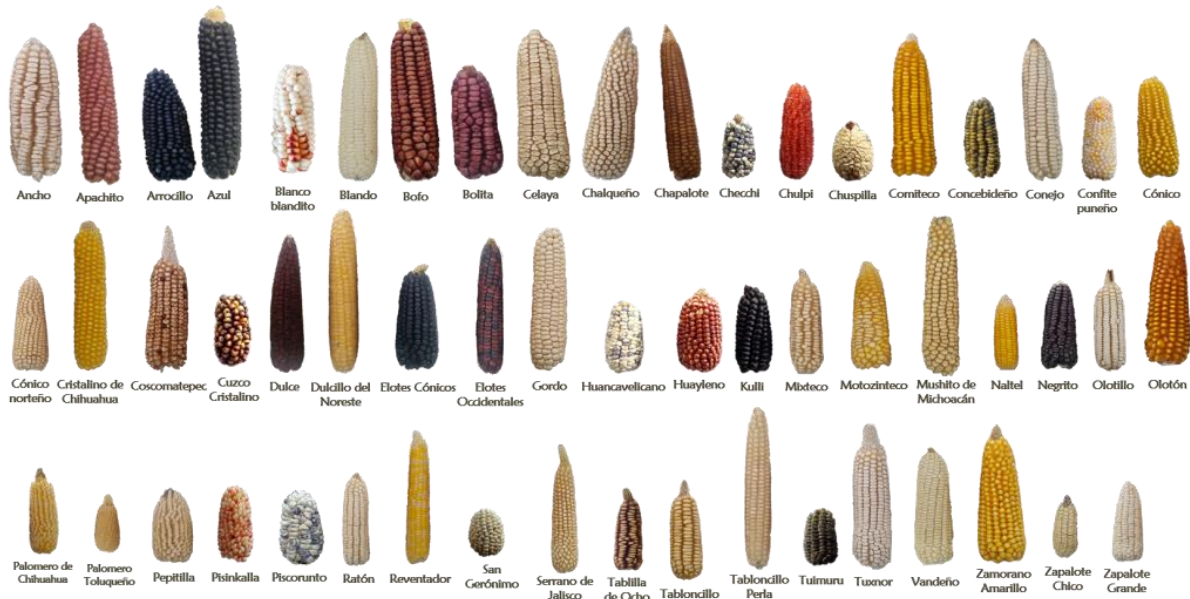


Figura 3. Algunas razas de maíz reportadas en México (fotografía tomada en el banco de germoplasma de CIMMYT)

La caracterización de las colecciones de germoplasma es un paso fundamental dentro del manejo de colecciones, dado que permiten, conocer, depurar u organizar los materiales y sobre todo identificar genotipos valiosos para ser usados directamente o utilizarlos en programas de mejoramiento genético. Las plantas cultivadas con importancia económica tienen sus patrones de identificación y caracterización; para llegar a estos protocolos se han realizado estudios básicos de las características para conocer la variabilidad de los rasgos cualitativos o cuantitativos que han resultado ser más útiles para la descripción (CIMMYT, 1991).

2.5 Características de las poblaciones del grupo racial Chapalote

Los maíces del grupo Chapalote incluye las razas Chapalote, Dulcillo del Noroeste, Elotero de Sinaloa y Reventador (Figura 4), cuyo cultivo se ha reportado predominantemente en elevaciones de 100 a 500 m en la planicie costera del Pacífico de Nayarit a Sonora y en el pie de monte y escarpa de la Sierra Madre Occidental,

donde se han obtenido muestras hasta cerca de los 2,000 m de altitud. Todas las razas de este grupo tienen mazorcas alargadas con forma de puro y granos con textura que va desde la cristalina, harinosa, hasta dulce (textura rugosa por el alto contenido de sacarosa) (CONABIO, 2020), (Wellhausen, 1951). Chapalote, Reventador y Dulcillo del Noroeste (Figura 4) han sido reportadas en baja frecuencia.

Elotero de Sinaloa ha sido reportada en frecuencias altas en las muestras colectadas recientemente, desde el noroeste, hasta la costa de Michoacán y en el estado de Guerrero (CONABIO, 2010). Las razas de este grupo, además de los usos comunes, resaltan por sus usos especiales: Chapalote para palomitas, pinole y ponteduro; Reventador para palomitas; Elotero de Sinaloa como su nombre lo indica, por su tipo de grano azul, semi-harinoso y dulce, para elotes; y Dulcillo del Noroeste para pinole, elotes y esquites (Hernández 1985), (Sánchez, 1989), (Wellhausen, 1951). Se considera que Chapalote y Reventador, mediante la intervención de teocintle, dieron lugar a otras razas o introgresaron características propias (mazorcas elípticas, coloraciones de grano) a razas similares en el noroeste de México (Wellhausen, 1951). Actualmente no se conocen reportes en donde se indique que estas razas coincidan con poblaciones de teocintle, aunque por su área de distribución es probable que las razas Reventador y Elotero de Sinaloa, que tienen mayor presencia hacia el occidente, sean simpátricas con algunas especies de teocintle en esta región (Wellhausen, 1951).



Figura 4: Imagen de mazorcas de los maíces pertenecientes al grupo de los Chapalotes.

Las razas pertenecientes a este grupo se adaptan a los ambientes con el mayor déficit de humedad, lo cual señala que el maíz se logra desarrollar bajo problemas de sequía

por lo anterior, todas las razas de este grupo podrían aportar genes de resistencia o tolerancia a la sequía (Linhart-Grant, 1996).

2.5.1 Características de la raza Chapalote

La raza de maíz Chapalote, se cree que se originó en México a partir del maíz tunicado, reliquia encontrada en estudios arqueológicos en Nuevo México, y en una raza primitiva de maíz reventador que se encuentra en la región de Sinaloa y Sonora, en el norte de México (Ortega-Guerrero, 2013).

Es considerada como una de las razas más antiguas de México. Se caracteriza por sus mazorcas débilmente tunicadas en forma de puro, con granos pequeños, redondos lisos, cristalinos de carácter reventador, y predominantemente de color café, pero que puede transformarse en rosado o rojo en el cruzamiento con otras razas (Wellhausen, 1951). Tiene el índice de gluma/grano más alto que cualquier otra raza en México. Las plantas de esta raza de maíz son cortas de aproximadamente 1.6 m. de altura. Su ciclo de cultivo es precoz y presenta abundante ahijamiento. Sus tallos son delgados con hojas angostas y largas.

Se distribuye principalmente de zonas bajas del noroeste de México, en los estados de Sinaloa y Sonora, aunque puede adaptarse a una gran amplitud de altitudes, pues también produce mazorcas a altitudes de 2,200 m, pero prospera mejor en altitudes bajas (Wellhausen, 1951). Se ha informado de colectas escasas de muestras en los municipios de Álamos, Moctezuma y Huásabas en Sonora. Se ha reportado su cultivo y uso en comunidades de los municipios de Choix y El Fuerte en el estado de Sinaloa (Ortega-Coutiño, 2008)

Entre las ventajas de los maíces pertenecientes a esta raza, destacan las siguientes: mejor manejo del riesgo agrícola, adaptación a las condiciones climáticas locales, estabilidad a la variabilidad climática, costos más bajos de los insumos necesarios para su producción, y muy importante, aptitud para la elaboración de preparaciones culinarias tradicionales (CONABIO, 2010).

La raza Chapalote es muy apreciada para su uso como pinole, ponteduro (bolitas de maíz tostado y esponjado adheridos con jarabe), atole, palomitas, esquites y coricos (galletas de maíz), (Wellhausen, 1951), (Ortega-Coutiño, 2008).

2.6 Importancia de la diversidad genética del maíz

La investigación en mejoramiento genético tiene como base la disponibilidad de recursos genéticos como principal insumo, en virtud de que los maíces nativos representan un gran reservorio de genes, que pueden ser utilizados, eventualmente, para hacer frente a las diferentes situaciones que plantea el ambiente o las demandas del mercado, siempre cambiantes. Un aspecto fundamental de la biodiversidad en el sector agropecuario es la variación genética de las poblaciones y las especies.

Actualmente los agricultores son los principales guardianes de la biodiversidad agrícola en el mundo, están completamente involucrados en las formas de crear, sostener e impulsar la evolución y adaptación de una gran variedad de especies vegetales y animales (Jarvis, 2008); en este sentido, los estudios que permitan coleccionar los maíces nativos, caracterizar las poblaciones fenotípica y genéticamente, mejorar las poblaciones con la participación de las comunidades, ayudar al mantenimiento de la diversidad presente y determinar la calidad nutricional, entre otras acciones, son fundamentales no sólo para ampliar el conocimiento e incrementar el bienestar, sino también para conservar el reservorio de genes presentes en los maíces nativos que se cultivan y considerarlas para posibles programas de mejoramiento genético.

2. 6. 1 Caracterización de la diversidad del maíz

Existen varias estrategias para llevar a cabo la caracterización de germoplasma; por un lado, los protocolos tradicionales de caracterización mediante variables de tipo morfológico, que necesariamente se enfrentan a los problemas referentes a la influencia del ambiente sobre la expresión de dichos caracteres, y es un hecho que al llegar a este punto, los investigadores afrontan la disyuntiva de establecer en un mismo ambiente materiales de diferentes procedencias o de comparar datos de diferentes

ambientes tratando de ajustar al máximo los diversos ambientes de evaluación para subconjuntos de grupos germoplásmicos; a pesar de sus desventajas, en el caso del maíz esta estrategia ha demostrado ser útil, pues ha servido para definir, en primera instancia, la estructura racial de las poblaciones de diferentes países, o regiones, en el caso de México, América Central y América del Sur (Wellhausen, 1951).

Durante las últimas dos décadas se ha presentado una revolución en la forma en que se analizan los seres vivos y su diversidad; se han generado y convertido en rutina métodos para caracterizar genéticamente a los individuos, poblaciones y especies; de la misma manera, se ha generado una gran cantidad de información y conocimientos nuevos sobre la evolución y relaciones de parentesco entre los organismos. Estos nuevos métodos permiten, entre otras cosas, cuantificar de manera puntual la diversidad genética, trazar el movimiento de individuos, medir el grado de endogamia, identificar individuos a partir de cualquier tejido, caracterizar nuevas especies y poblaciones, y reconstruir patrones históricos de dispersión (Mazzinelli-Valoti, 2009).

Estas aplicaciones resultan de gran interés para afrontar cuestiones prácticas como determinar poblaciones en riesgo por alto grado de endogamia, el nivel de cruzamiento entre cultivos genéticamente modificados y parientes silvestres o el nivel de parentesco o diferenciación entre dos o más poblaciones (Freeland, 2005). A pesar de las ventajas que implica el uso de marcadores moleculares, hay un consenso entre los fitomejoradores sobre su uso como complemento a la información fenotípica; es decir, la caracterización agromorfológica debe seguir considerándose para fines de tipificación integral de las razas de maíz.

Comúnmente cada grupo de maíz se diferencia de otro en precocidad, color de grano y usos. Adicionalmente, una variedad del grupo se siembra en un sitio particular del nicho o microrregión y en un periodo específico, que depende de la humedad del suelo, la temperatura, la altitud o del inicio de las lluvias; el estrato o nivel ambiental es cada sitio del nicho, con un régimen higrótérmico específico (Gil López, 2004). La diversidad de maíz se encuentra principalmente en donde imperan condiciones de temporal o

secano y sistemas campesinos de producción (Herrera-Ortega, 2004) y los agricultores generalmente disponen de más de una variedad nativa adaptada a su ambiente (Aceves, 2002)

2. 7 Métodos Moleculares para la identificación de germoplasmas

Los métodos moleculares mediante la obtención y utilización de los marcadores moleculares pueden revelar detalladamente la identidad y variabilidad de individuos y poblaciones mediante las huellas genética, por lo que su aplicación en la identificación y caracterización de razas confiere ventajas.

Marcadores moleculares son definidos como cualquier fenotipo molecular oriundo de un gen expreso, o cualquier segmento de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) identificado, pudiendo ser o no expreso. Incluyen desde las aloenzimas e isoenzimas (frecuentemente referidos como marcadores bioquímicos), hasta las técnicas que estiman la variación directamente en el ADN (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Los marcadores moleculares reflejan diferencias hereditarias (polimorfismos) en secuencias de ADN homologas entre individuos. Estas diferencias pueden ser debido al polimorfismo de un nucleótido simple (SNPs), inserción o delección (INDELs), o un rearreglo (translocación o inversiones). Los métodos de detección de polimorfismos envuelven la utilización de: (1) endonucleasas de restricción, (2) hibridación de ácidos nucleicos, (3) amplificación de secuencias de ADN vía PCR (Polymerase Chain Reaction) o (4) secuenciación.

2.7.1 Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)

Los RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) permiten estudiar el genoma con una mayor cobertura al incluir secuencias codificadoras y no codificadoras del ADN (exones e intrones). Esto permite detectar con mayor eficiencia cambios genéticos puntuales, comparado con las proteínas (Wang *et al.*, 1992). Las principales ventajas de los RFLPs radican en la presencia de un número ilimitado de ellos, no son afectados por el medio ambiente y pueden ser evaluados en cualquier etapa de

desarrollo de la planta. La técnica está basada en la digestión del ADN total de un individuo con diferentes enzimas de restricción. Esta restricción produce cantidades equimolares de fragmentos para una molécula de ADN dada. Los fragmentos resultantes son separados por electroforesis en geles de agarosa y transferidos por capilaridad a una membrana de nylon (*Southern Blot*). Esta membrana es hibridada con una sonda (radioactiva o no). El producto de la hibridación es visualizado por medio de una autoradiografía de rayos-X, de acuerdo con el peso molecular de la banda. Básicamente, los RFLPs son causados por re-arreglos del ADN, tales como pérdidas, inserciones o sustituciones de secuencias o nucleótidos únicos, lo que significa la ganancia o pérdida de sitios de restricción. Esto es detectado a través de diferencias en el peso molecular de los fragmentos homólogos de restricción del ADN genómico al hibridar con la sonda seleccionada.

Los RFLPs se heredan en forma Mendeliana simple, y si la sonda empleada representa una copia única, ella es considerada como un *locus* y las variaciones en patrones son analizados como alelos (bialélicos o multialélicos) (Doebley-Wendel, 1989). La expresión de estos marcadores es codominante, vale decir, todas las formas alélicas del gen son distinguibles, permitiendo detectar los híbridos y estudiar el flujo de genes entre poblaciones. El nivel de polimorfismo que esta técnica puede detectar depende en gran medida de la naturaleza de las sondas empleadas, enzimas de restricción utilizadas y de la complejidad en cuanto al tamaño del genoma de la especie en estudio.

Dentro de las principales desventajas de los RFLP están la clonación de las sondas, detección de RFLP en las membranas y el uso de radioactividad; tareas consideradas laboriosas, lentas y caras. A pesar de esto, el desarrollo de la técnica no radioactiva ha simplificado esta metodología (Foolad, Arulsekhar, & Becerra, 1995).

2.7.2 Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPDs)

Esta técnica amplifica simultáneamente fragmentos de ADN con un iniciador de secuencia arbitraria simple en una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR - *Polymerase Chain Reaction*). Los polimorfismos RAPDs (*Random Amplified*

Polymorphic DNA) son producidos por rearrreglos o INDELS en o entre oligonucleótidos inhibidores ligados a sitios específicos y conocidos del genoma (Welsh & McClelland 1990). Los productos de la amplificación son separados en geles de agarosa mediante electroforesis y las bandas visualizadas, de diferente peso molecular, representan diferentes *loci*. En algunas especies, la técnica da la opción de usar dos o más partidores dentro de la misma reacción para aumentar el número de bandas, logrando una mayor cantidad de información por reacción. Los productos de la reacción dependerán del genoma en estudio, de la enzima utilizada para producir los fragmentos y de las condiciones de la reacción. Los resultados de RAPD obtenidos en plantas indican su herencia dominante, su habilidad para detectar regiones de ADN altamente variables (5-10 *loci* por partidador), su tremenda potencialidad en el mapeo de genes, identificación de razas, estudios de hibridación inter e intraespecífica y en el estudio de la variación genética en poblaciones altamente emparentadas (Williams Kubelik, 1990).

Las principales ventajas de esta técnica son la rapidez en la obtención de resultados, el costo, el uso nulo de radioactividad, menor inversión en equipos y la cantidad reducida de ADN requerida. Sin embargo, como desventaja aparece la inconsistencia de los datos. Diferentes condiciones de laboratorios con pequeñas alteraciones en los parámetros de amplificación pueden dar origen a resultados diferentes. Esta desventaja se puede reducir logrando un alto grado de estandarización de las condiciones de reacción y de amplificación, usando un control interno para asegurar la reproducibilidad de los productos de la amplificación, además del registro de las bandas nítidas y consistentes

La técnica del PCR también ha sido ampliamente usada para estudiar diversidad genética de cultivos y su relación con sus ancestros silvestres (Demeke-Adams, 1992), (Vierling, 1992), (Sharma & Knox, 1996).

2.7.3 Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP)

En esta técnica se combinan los principios de la técnica RFLP y la reacción de PCR, donde una muestra de fragmentos producidos por la acción de enzimas de restricción del ADN bajo estudio es amplificado selectivamente (Ferreira&Grattapaglia, 1998). El procedimiento comienza con la digestión del ADN genómico de los individuos con enzimas de restricción que identifican 4 y 6 bases de reconocimiento, lo cual genera fragmentos de tamaño preferentemente pequeño, luego se ligan adaptadores de secuencia conocida a cada extremo y para el proceso de amplificación se usan iniciadores complementarios a estos adaptadores, manteniendo el sitio de restricción más un cierto número de nucleótidos (3 generalmente) que deben agregarse al extremo 3'. Finalmente, el proceso implica dos alternativas de detección de las bandas, la primera es la marcación radioactiva de los productos amplificados en la última etapa de amplificación, su separación en geles de poliacrilamida, secado del gel y su visualización en auto radiografías. La segunda alternativa usa la tinción directa del gel con nitrato de plata. Los resultados entre ambas alternativas son comparables, siendo esta última de menor costo y fácil aplicación. Una de las mayores ventajas de esta técnica es que en una sola reacción se puede identificar alrededor de 50 *loci* en un tiempo corto (Tohme, González, & Beebe, 1996).

Los AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), al igual que RAPD, son de herencia dominante y pueden detectar una variación considerable del genoma, lo cual se refleja en el número de productos amplificados con una sola combinación de iniciadores. La eficiencia en detectar polimorfismo puede ser varias veces mayor que la obtenida con RAPD y RFLP. (Vos Hogers, y otros, 1995).

Esta metodología ha sido ampliamente usada en diversas especies para medir diversidad genética, tales como: lechuga (*Lactuca sativa*) (Hill *et al.*, 1996) y lenteja (*Lens culinaris*) (Sharma & Knox, 1996) entre otras. Anteriormente esta técnica tenía gran utilización en la saturación de mapas genómicos y en la identificación de fragmentos ligados a genes de interés comercial (Colwin, y otros, 1995).

2.7.4 Microsatélites o Repeticiones de Secuencias Simples (SSR)

Los microsatélites o SSR (*Simple Sequence Repeat*) son secuencias de 1 a 6 nucleótidos repetidas en *tandem* y existen en forma abundante en plantas (Condit & Hubbell, 1991). Mediante los microsatélites se puede medir la diversidad entre genotipos amplificando, mediante PCR, la región del ADN genómico que contiene estas secuencias repetidas. El uso de microsatélites ha ido aumentando mediante la producción de bibliotecas de iniciadores y la secuenciación automática fluorescente que permiten el diseño de los cebadores (*primers*) que rodean los microsatélites. Los fragmentos generados son separados en geles de poliacrilamida y visualizados radioactivamente o por tinción con nitrato de plata (Brondani & Tarchini, 1998).

Los SSR son muy atractivos para los genetistas pues combinan varias ventajas como son su codominancia, multiallelismo y su alta heterogeneidad. El alto nivel de polimorfismo que detecta permite una discriminación precisa entre individuos altamente emparentados. Además de ser altamente polimórficos, los microsatélites usan cantidades mínimas de ADN, equivalentes a las que se usan en RAPD. Las condiciones de amplificación y de reacción son especie-específicas y la variación en el largo de los productos amplificados mediante PCR es función del número de unidades repetidas (Brondani & Tarchini, 1998).

En general, la amplificación de microsatélites ha demostrado que éstos son más variables que isoenzimas, RFLP, AFLP y RAPD. Por ejemplo, en un estudio realizado en pepino (*Cucumis sativus*), 29 isoenzimas no mostraron polimorfismo entre dos genotipos comerciales (Perl-Treves *et al.*, 1985). Dentro del mismo género RAPD detectó un 38% de polimorfismo, mientras que los microsatélites detectaron un 71%, e incluso detectaron diferencias genéticas entre cultivares altamente emparentados que mediante otras técnicas no habían podido ser distinguidos. Es así como se ha comprobado, en diversas especies, la complementariedad de todas las técnicas mencionadas anteriormente en el estudio global de la organización genética del germoplasma (Katzir, Danin-Poleg, Tzuri, Karchi, & Lavi, 1996).

Una de las desventajas de los microsatélites es el tiempo y costo involucrado en el proceso del diseño de cada cebador, sin embargo, existe la posibilidad de usar los mismos cebadores en más de una especie. Esto es debido, a que existe un grado de conservación de los microsatélites entre genomas de especies tan distantes como son algunos mamíferos, plantas anuales y perennes. Esto no es generalizado en todas las especies, puesto que, al comparar entre cereales de grano pequeño como trigo, cebada y centeno, se ha detectado una limitada conservación de las secuencias microsatélites (Akkaya & Bhagwat, 1992).

2.7.5 Secuenciación de Nueva Generación (NGS)

Los métodos de NGS (secuenciación de próxima generación) producen lecturas de menor longitud que el método de Sanger (el promedio varía entre 30pb-250pb dependiendo de la tecnología utilizada) esto se debe principalmente a un fenómeno conocido como desfasamiento, que es provocado porque las reacciones bioquímicas utilizadas durante la secuenciación, por lo que nunca tienen un rendimiento del 100% y algunas moléculas se “atrasan” quedando fuera de sincronía (Gil López, 2004).

Entre mayor sea la longitud del fragmento a secuenciar, existe una mayor probabilidad de que el desfasamiento ocurra, así que los fabricantes de secuenciadores NGS optaron por reducir la longitud de la lectura en lugar de perder calidad de datos. La disminución del precio de la secuenciación como resultado del surgimiento de los NGS ha permitido que sea factible la producción de marcadores moleculares de forma directa en un secuenciador. A esto se le conoce como Genotipificación por Secuenciación (GBS por sus siglas en inglés).

Aunque el GBS es relativamente sencillo para organismos con genomas pequeños, conforme crece el tamaño y la complejidad del genoma, como suele ser el caso de las plantas, es necesario recurrir a un método de reducción de complejidad para asegurar que la producción de marcadores será homogénea y representativa (Escobedo-Landín, 2012).

La técnica de GBS por lo general se basa en el uso de enzimas de restricción tipo II para reducir la complejidad del genoma y de esta forma producir la biblioteca de fragmentos que será secuenciada. El uso de este método ofrece muchas ventajas: es rápido, sencillo, altamente específico, reproducible, y puede alcanzar regiones del genoma que no son fáciles de estudiar utilizando otros métodos.

Sin embargo, es importante recalcar que el éxito de la reducción de complejidad depende en gran medida de la combinación de enzimas de restricción que se seleccionan para cada organismo. Se debe buscar una combinación que evite producir muchos marcadores en regiones repetitivas del genoma o zonas de baja expresión. Para ello, por lo general se selecciona al menos una enzima sensible a la metilación ya que las zonas de menor expresión del genoma tienden a estar metiladas (Linhart-Grant, 1996).

Es recomendable utilizar enzimas que produzcan un *overhang* (bases nitrogenadas sin complemento) de más de una base, ya que facilita el proceso de ligación de adaptadores que permitirá el análisis en paralelo de muchas muestras en una misma corrida de secuenciación. Después de la reducción de complejidad, se hace una amplificación selectiva con la cual se generan más copias de los fragmentos que tendrán mayor probabilidad de ser secuenciados en el dispositivo NGS. Esto quiere decir que se eliminan fragmentos de alto peso molecular (>1kb) o de muy bajo peso molecular, ya que este tipo de moléculas no producen buena calidad de datos al momento de secuenciar. Una vez producida la biblioteca mediante la reducción de complejidad y la amplificación selectiva, se secuencian los fragmentos resultantes.

Posteriormente se deben de analizar la información producida para seleccionar los marcadores moleculares que tengan una mayor calidad de datos y que permitan detectar polimorfismos entre las diferentes muestras. Una de las grandes ventajas del método de GBS es que detecta Polimorfismos de Nucleótido Único (single nucleotide polymorphisms, o SNP) inclusive en organismos para los cuales no se tiene un genoma de referencia. (Petroli, 2013).

2. 7.6 Plataforma DArTseq

Este método evolucionó a partir de la plataforma de marcadores DArT (Jaccoud *et al.*, 2001) basada en microarreglos (microarrays), la cual fue combinada con las bondades proporcionadas por los NGS, permitiendo un mayor alcance al método de secuenciación previo (Sansaloni *et al.*, 2011). DArTseq™ es una nueva implementación de la secuenciación de representaciones genómicas producto de la reducción de la complejidad construida a partir de la combinación de enzimas de restricción.

Esta plataforma se ha utilizado en estudios del genoma de más de 175 organismos, principalmente en plantas cultivadas y especies forestales (<http://www.diversityarrays.com/>). Los datos generados son principalmente utilizados en procesos de mejoramiento genético, conservación de germoplasma y caracterización genotípica de bancos de germoplasma cuyos objetivos son; resguardar material con valor agronómico importante y custodiar la diversidad genética (Carling *et al.*, 2015). Su empleo ha facilitado la producción de estudios de evaluación de diversidad genética en fresa (Sánchez & Sevilla *et al.*, 2015) y sandía (Yang *et al.*, 2016).

Este método de genotipificación de alto rendimiento es capaz de desarrollar simultáneamente el perfil genómico de miles de muestras de DNA. Su etapa más importante es el uso de enzimas de restricción para reducir la complejidad del genoma y de esta forma producir la biblioteca de fragmentos que será secuenciada (Davey *et al.*, 2011), estos elementos ofrecen muchas ventajas: rápido, sencillo, altamente específico, reproducible y puede alcanzar regiones del genoma que no son fáciles de estudiar utilizando otros métodos. Sin embargo, es importante recalcar que el éxito de la reducción de complejidad depende en gran medida de la combinación de enzimas de restricción que se selecciona para cada organismo (Figura 5). Se debe buscar una combinación que evite producir muchos marcadores en regiones repetitivas del genoma o zonas de baja expresión. Para ello, por lo general se selecciona al menos

una enzima sensible a la metilación ya que las zonas de menor expresión del genoma tienden a estar metiladas (Elshire et. al. 2011).

Una vez producida la biblioteca mediante la reducción de complejidad y la amplificación selectiva, se secuencian los fragmentos resultantes. Posteriormente, se debe analizar la información producida para seleccionar los marcadores moleculares que tengan una mayor calidad de datos y que permitan detectar polimorfismos entre las diferentes muestras. La caracterización genética se basa en la producción de decenas, incluso cientos, de miles de marcadores moleculares. La tecnología DArTseq integra in silico-DArT con marcadores codominantes SNPs (SNP, por sus siglas en inglés). Los primeros son marcadores dominantes conocidos también como PAVs (Presence/Absence Variation), basados en los principios de los microarreglos DArT (Jaccoud et. al., 2001), en donde fragmentos de ADN pueden estar o no presentes en una muestra, dependiendo de la naturaleza del genoma y de la acción de las enzimas de restricción sobre el mismo. Los segundos marcadores (SNPs) son marcadores codominantes y están determinados básicamente por la lectura, el alineamiento y la comparación, de las secuencias de aquellos fragmentos generados en la etapa anterior (Sherry-Ward, 2001).

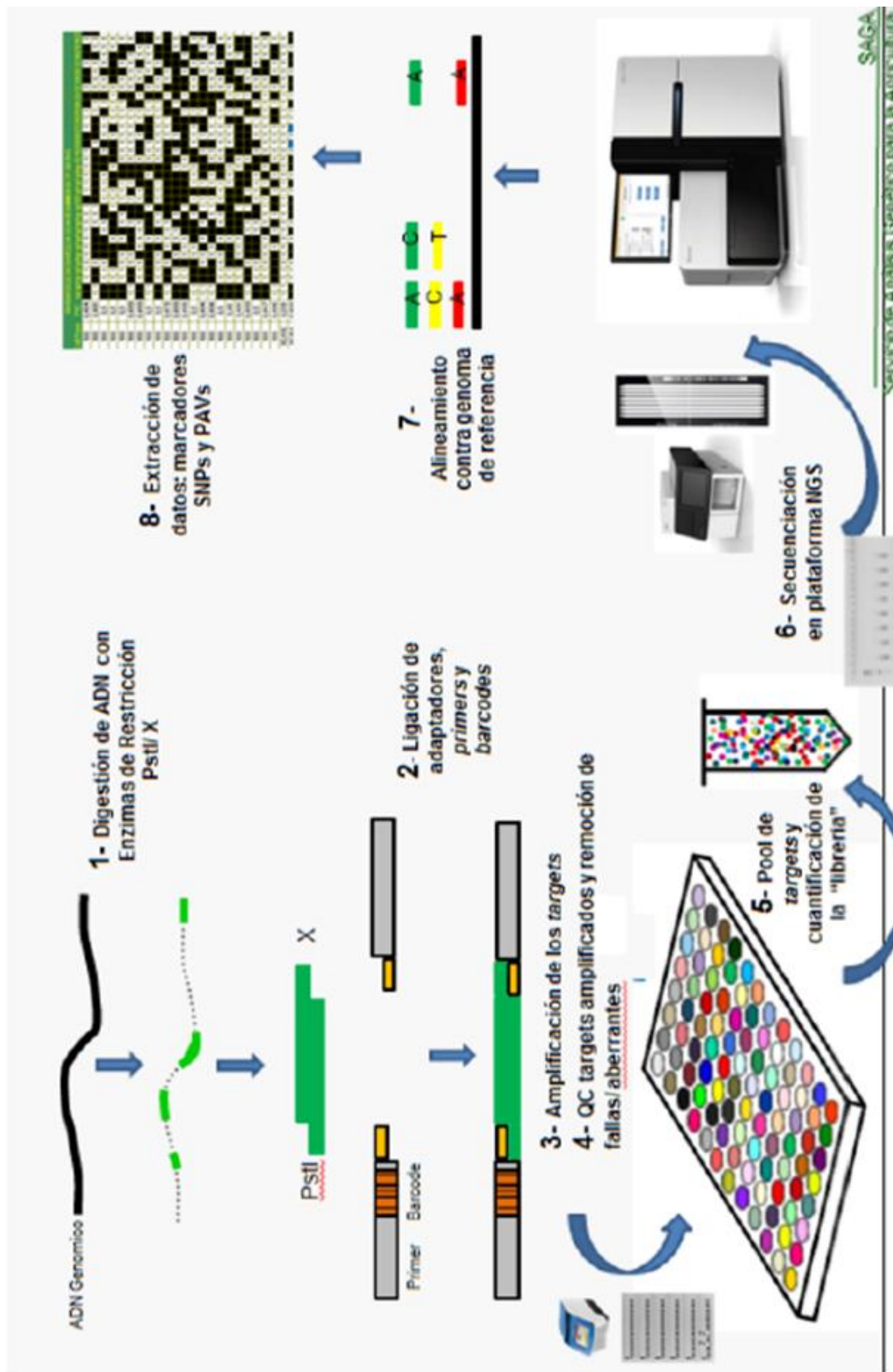


Figura 5: Plataforma de genotipificación de alto rendimiento DArTseq

III. HIPÓTESIS

Existe variación agromorfológica y genética en las poblaciones clasificadas como pertenecientes a la raza Chapalote del Banco de Germoplasma de CIMMYT.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar la variación agromorfológica y genotípica de las poblaciones de maíz Chapalote colectadas en el estado de Sinaloa y Sonora, resguardadas en el Banco de Germoplasma de CIMMYT.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Caracterización agromorfológica las poblaciones de Chapalote obtenidas

- Sembrar en los municipios de Culiacán y Navolato las semillas de las 18 poblaciones proporcionadas por el Banco de Germoplasma de CIMMYT de Chapalote, más las poblaciones testigo.
- Evaluar el comportamiento de las diferentes variables agromorfológicas de los individuos sembrados en campo en las dos locaciones utilizadas, realizando los análisis estadísticos correspondientes en el programa JMP (*John's Macintosh Project*).

4.2.2 Caracterización genotípica

- Extraer ADN a partir de tejido foliar de plántulas de las 18 poblaciones de la raza Chapalote sembradas en invernadero.
- Desarrollar a través del método DArTseq una biblioteca (representación genética).
- Secuenciar los fragmentos producidos durante la construcción de la biblioteca utilizando un Secuenciador de Próxima Generación (Novaseq 6000) de Illumina.
- Extraer datos genotípicos de las 18 poblaciones a partir del empleo del software DArTsoft 1.4
- Filtrar los datos genotípicos para la identificación de marcadores moleculares SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) de alta calidad. Utilizar los SNPs descriptos para calcular índices de diversidad genética dentro de las colectas mediante la utilización del programa BIO-R.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Fuente de Germoplasma.

Se estudió un conjunto de 18 accesiones nativas pertenecientes a la Colección Núcleo del Banco de Germoplasma de Maíz del CIMMYT, las cuales están clasificadas como pertenecientes a la raza Chapalote, sumando a ellas 7 accesiones testigos las cuales 5 eran pertenecientes a la clasificación de la raza tuxpeño, esto con el objetivo de hacer una diferenciación notoria de las características agromorfológicas.

En cuanto a los análisis genéticos, se sumaron 9 testigos de los cuales ya se tenían datos genotípicos, esto con el objetivo de observar el agrupamiento y diferenciación en distanciamiento génico.

De las 18 accesiones de estudio de la raza Chapalote, 13 fueron colectados en México, específicamente en el Estado de Sinaloa, 3 en el Estado de Sonora y una colectada en Perú.

De acuerdo con la información de los datos de pasaporte proporcionada por el Banco de Germoplasma, de las 18 accesiones principales en este estudio únicamente 5 se podrían considerar raza pura, el resto tiene a Chapalote como raza primaria o secundaria (Tabla1).

Número de colección	Nombre en el proyecto	Nombre accesión	Raza primaria	Raza secundaria
SINA 2	Pob 1	Chapalote	Raza pura	Chapalote
SINA 6	Pob 2	Ocho carreras	Chapalote	Ocho carreras
SINA 13	Pob 3	Reventador	Reventador	Chapalote
SINA 15	Pob 4	Reventador	Reventador	Chapalote
SINA 22	Pob 5	Reventador negro	Reventador	Chapalote
SINA 35	Pob 6	Chapalote	Raza pura	Chapalote
SINA 62	Pob 7	Chapalote	Raza pura	Chapalote
SINA 65	Pob 8	Chapalote	Raza pura	Chapalote
SINA 67	Pob 9	Chapalote	Raza pura	Chapalote
SINA 77	Pob 10	Chapalote	Tuxpeño	Chapalote
SINA 83	Pob 11	Pinoler ahumado ch	Chapalote	Chapalote
SINA 113	Pob 12	Chapalote	Raza pura	Chapalote
SINA 114	Pob 13	Chapalote	Chapalote	Reventador
SINA 139	Pob 14	Reventador	Chapalote	Reventador
SONO 27	Pob 15	Reventador	Reventador	Chapalote
SONO 55	Pob 16	Chapalote	Chapalote	blandito de Sonora
SONO 60	Pob 17	Chapalote	Chapalote	Mezcla de razas
PERU 427	Pob 18	Amarillo matizado	Chaparreño	Mezcla de razas

Tabla 1: Información de pasaporte de las poblaciones de Chapalote del Banco de Germoplasma del CIMMYT.

5.2 Localización del experimento para caracterización agromorfológica.

La caracterización agromorfológica de los materiales de estudio en este proyecto se llevó a cabo en dos localidades, una en el municipio de Navolato y otra en el municipio de Culiacán (Figura 6) ambos ubicados en la zona centro del estado de Sinaloa, en una altitud promedio de 478 metros sobre el nivel del mar (msnm); su clima predominante es cálido subhúmedo con lluvias principalmente en verano.

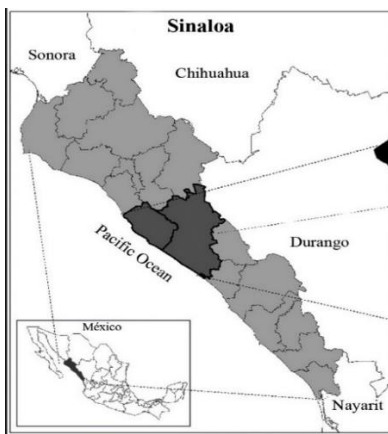


Figura 6: Mapa del estado de Sinaloa, resaltando los municipios de Culiacán y Navolato.

5. 3 Caracterización agromorfológica.

5.3.1 Variables evaluadas.

Las 18 accesiones se evaluaron para un total de 17 variables, las cuales fueron divididas en 4 categorías; a) variables vegetativas, en la que se incluyeron los caracteres altura de planta (ALP), altura de mazorca (ALM), número de hojas arriba de la mazorca (NHA) y número de hojas debajo de la mazorca (NHB); b) variables de espiga como, longitud de espiga (LOE), y número de espiguillas (NES); c) variables de mazorca, tomando en cuenta el número de hileras de la mazorca (NHM), longitud de mazorca (LOM), diámetro de mazorca (DIM), peso de mazorca (PEM), peso de olote (PEO) y diámetro de olote (DIO); d) variables de grano, como el grosor de grano (GRG), ancho de grano (ANG), longitud de grano (LOG) y peso de 100 granos (PEG); e) variable de productividad, representada por el rendimiento de grano (REG).

5.3.2 Variables vegetativas.

La variable altura de planta (ALP) se tomó a partir del punto en que la planta emerge y tiene su contacto con superficie del suelo hasta la base de la espiga, se midió con una regla y el resultado se expresó en centímetros. Para el caso de la altura de mazorca (ALM), se midió a partir del punto inicial de la base de la planta del suelo hasta el nudo del tallo donde se inserta la mazorca principal, y fue medido de la misma manera que la variable anterior. Las variables número de hojas arriba (NHA) y debajo de la mazorca (NHB) se contabilizó el número de hojas encontradas por encima de la mazorca principal y debajo de la misma (Figura 7).

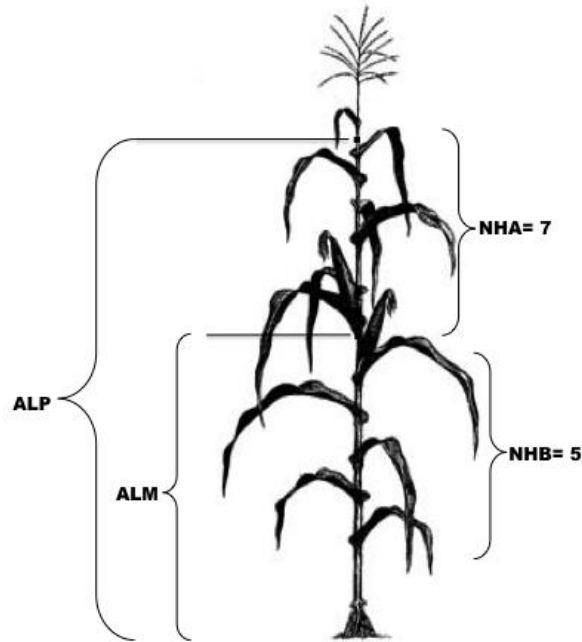


Figura 7: Demostración de los espacios que cubre cada variable vegetativa.

5.3.3. Variables de espiga.

Para la medición de la variable longitud de espiga (LOE), se midió desde la parte inferior del pedúnculo de la espiga, hasta el extremo superior de la espiga central y se expresó en centímetros (cm). La toma del número de espiguillas (NES) se realizó contando el número de espiguillas primarias, secundarias y terciarias encontradas en la propia espiga.

5.3.4. Variables de mazorca.

El número de hileras de la mazorca (NHM), se obtuvo contando el número de hileras o carreras de granos encontradas en la mazorca. La longitud de mazorca (LOM) fue registrada con una regla métrica de 30 cm, desde la base hasta el ápice de la mazorca. El diámetro de mazorca (DIM) se midió sobre la parte central de la mazorca principal, para ello se utilizó un vernier digital y se expresó en milímetros (mm), esto mismo se hizo para obtener los datos del (DIO). Por otro lado, el peso de mazorca (PEM) y el peso del olote (PEO), se tomaron pesando individualmente cada mazorca y cada olote, utilizando para ello una báscula digital y expresándolos en gramos (grs).

5.3.5. Variables de grano.

El grosor de grano (GRG) se tomó de la parte central de la mazorca, para ello se dejaron diez granos tal y como están insertados en la mazorca y utilizando un vernier digital se obtuvo el dato del grosor en mm. Para ancho de grano (ANG), se utilizaron los mismos granos de la variable anterior, se colocaron de manera equidistantes uno tras otro, y con un vernier digital se obtuvo este dato en mm. Mientras que para la longitud de grano (LOG), se utilizaron los mismos granos, pero en esta ocasión, se colocaron en fila por la parte longitudinal uno tras otro y con un vernier digital se obtuvo este dato en mm. peso de grano (PEG), se evaluó utilizando 100 granos provenientes de cada mazorca evaluada individualmente, se colocaron sobre una balanza digital, registrándose en grs los datos correspondientes.

Para la variable de rendimiento de grano (REG) solo fue necesario realizar la resta del resultado obtenido del peso de la mazorca y posteriormente peso del olote, para con ello calcular cual era el peso total de esta variable.

5.4 Caracterización Genética.

El análisis de caracterización genotípica se hizo, mediante la utilización de la tecnología de genotipificación DArTseq, desarrollada por la empresa australiana *Diversity Arrays Technology*, y se llevó a cabo en la plataforma de genotipificación de alto rendimiento del Laboratorio del Servicio de Análisis Genético para la Agricultura (SAGA), del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), ubicado en Carretera México-Veracruz Km. 45, El Batán, Texcoco, México.

5.4.1 Obtención de DNA genómico

Las 18 accesiones del experimento fueron sembradas en charolas de unicel, bajo condiciones controladas en el invernadero de CIMMYT, ubicado en la estación experimental de El Batán, con coordenadas 19°31'46.6"N 98°50'42.5"W. Se usaron 30

plantas elegidas al azar de cada accesión para hacer una muestra compuesta de ADN (“*bulk*”). Se cosecharon hojas frescas y sanas de plantas de alrededor de 25 días de comenzada su germinación. El tejido vegetal obtenido de estas plántulas se colectó en bolsas de tipo glacín y se almacenó a -80 °C, para posteriormente llevarse a cabo el proceso liofilización. Una vez obtenido el tejido totalmente deshidratado, se cortó un disco de 30 mm de área de tejido de cada hoja. Este tejido fue depositado en tubos de extracción de 1.1 mililitros (ml), junto con una esfera metálica pequeña, la cual favorece el proceso de molienda en el equipo Geno/grinder 2010. La extracción de ADN genómico de todas las accesiones se llevó a cabo mediante la utilización del método bromuro trimetil amonio de cetilo (CTAB por sus siglas en inglés) (CIMMYT, 2006).

El ADN obtenido se purificó mediante el kit de purificación de *Symon*, esto con la finalidad de eliminar cualquier producto de desecho del proceso de extracción, como lípidos, proteínas etc. que puedan afectar en pasos posteriores. Una vez realizada la purificación, se cuantificó en un NanoDrop 8000, con la finalidad de conocer la concentración y calidad del producto obtenido a partir de la extracción, para posteriormente diluirlo a la misma concentración (200 ng/ul) y presentarlo para su procesamiento de genotipificación por secuenciación a través del método DArTseq™, en el Laboratorio de Servicio de Análisis Genéticos para la Agricultura (SAGA).

5.4.2 Reducción de la complejidad genómica.

El método de reducción de complejidad se realizó con la utilización de dos enzimas de restricción, una de corte frecuente (*Pst*I) y una de corte específico (*Nsp*I). La primera se combinó con la segunda enzima que actúa de manera más precisa sobre el genoma de la especie *Zea mays* y es más apropiada para estudios de diversidad genética en esta especie debido a la cantidad de cortes que realiza a lo largo de todo el genoma, lo cual ayuda a obtener una mayor cantidad de marcadores. Estas enzimas junto con una enzima ligasa y un adaptador común estaban contenidos en una mezcla conocida como de digestión-ligación.

En el caso del adaptador común, este contiene una secuencia afín al sitio de corte de la enzima de corte específico. Posteriormente, la mezcla se dispersó en una placa de 96 pocillos con un volumen de 16 microlitros (μl) por pocillo. A través de la utilización de un replicador, a esta placa se le agregaron $2\mu\text{l}$ de cada muestra de DNA y $2\mu\text{l}$ adaptadores (*barcodes*), los que contenían la secuencia afín a la enzima de corte frecuente.

Estos *barcodes*, que actúan como “códigos de barra”, permiten identificar a que muestra de ADN pertenece cada uno de los fragmentos genómicos obtenidos a partir de la digestión con las enzimas. El resultado final de este procedimiento fue una placa con la mezcla de digestión-ligación, ADN de las 18 accesiones y *barcodes*, llegando a un volumen total de $20\mu\text{l}$ por pocillo.

La placa fue posteriormente incubada en un termociclador por un periodo de 3 horas a 37°C y 20 minutos a 60°C , condiciones necesarias para la activación del complejo de enzimas. Simultáneamente, mientras el ADN era digerido y fragmentado, la ligasa se encargaba de unir el par de adaptadores los cuales permitirían el manejo de las muestras a lo largo del proceso (identificación) y su amplificación (común).

5.4.3 Amplificación de fragmentos.

En esta etapa se realizó la amplificación de los fragmentos de ADN producidos por la acción enzimática a través de una reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Esta solución de PCR estaba compuesta por: Buffer de PCR, dNTPs, EBPCR, Nsp1 *primers* y enzima RedTaq. Posteriormente la placa fue nuevamente colocada en termociclador para darle las condiciones a la Redtaq polimerasa de “construir” miles de copias de cada uno de los fragmentos. Cada uno de los ciclos fue programado con las siguientes condiciones: 20 seg. a 94°C , 30 seg. a 58°C y 45 seg. a 72°C , esto fue durante 30 ciclos, adicionalmente se tuvo un ciclo inicial de 1 min. de desnaturalización a 94°C y al final uno de elongación de 7 min. a 72°C para después de este dejarse en modo reposo a 10°C durante 5 min.

La amplificación de estos fragmentos ocurrió gracias al uso de *primers* (cebadores) complementarios a los adaptadores que fueron utilizados en la digestión-ligación. Cabe destacar que estos cebadores también contenían secuencias adicionales en su extremo 5' para hacerlos compatibles con fragmentos únicos de secuenciación.

Después de la amplificación se revisó la calidad de los fragmentos (ahora llamados targets) en un gel de agarosa con una concentración de 1.2%. En este control de calidad se buscó obtener un pequeño barrido de ADN, lo que demostraba un rango de tamaño de diferentes fragmentos, evitando dímeros de *primers*. Los barridos de targets deben ser uniformes en intensidad, tamaño y migración en el gel. Aquellos targets que presentaron una diferencia de migración en el gel, ya sea que hayan sido desplazados o fallidos, fueron removidos del proceso y no fueron secuenciados.

5.4.4 Purificación y cuantificación

Esta etapa comienza con el agrupamiento de los targets en una sola solución, estos conglomerados de muestras de ADN son llamados pools. Cada pool consiste en la incorporación de 10µl de cada pocillo de una placa de PCR con los fragmentos amplificados exitosamente, en un único tubo de dos mililitros.

El objetivo es simplificar el manejo de los fragmentos a la hora de incorporarlos al secuenciador. Posterior a este paso, se llevó a cabo la purificación de los targets con un kit comercial (*QIAquick PCR Purification Kit*).

Una vez purificada la biblioteca de fragmentos, se realizó el proceso de cuantificación con la finalidad de conocer la concentración exacta en la que se encontraba el producto para realizar los cálculos pertinentes en el proceso de dilución y secuenciar la cantidad correcta que nos garantice un mejor resultado al momento de obtener los marcadores moleculares.

Este proceso de cuantificación se realizó con el equipo *CUBIT*, mediante la lectura de la fluorescencia emitida por los fragmentos, los cuales fueron teñidos con los fluoróforos del kit del equipo antes mencionado.

5. 4. 5 Secuenciación.

Para el proceso de secuenciación fue necesario realizar una dilución de la biblioteca para llevarla a la concentración de trabajo, siendo de 0.7 picomolar, una vez realizada la dilución, se procedió a cargar el producto en el cartucho de reactivos para iniciar el proceso de corrida en el equipo de Tecnología illumina denominado *NOVASEQ 6000*.

VI. RESULTADOS

Análisis agromorfológicos

Teniendo a consideración los resultados obtenidos por la observación y análisis físico de las mazorcas obtenidos a partir de las 18 poblaciones principales de Chapalote, las mazorcas de Chapalote se tipificaron como: mazorcas débilmente tunicadas en forma de puro, con granos pequeños, redondos lisos, cristalinos de carácter reventador, y predominantemente de color café, pero que puede presentarse en rosado o rojo en el cruzamiento con otras razas. Al tomar fotografías de las mazorcas mencionadas, pudimos hacer una preclasificación de las poblaciones que sí coincidían con dichos aspectos fenotípicos.



Figura 8: fotografía tomada a la colecta de mazorcas de cada población.

Así 12 de las 18 poblaciones clasificadas originalmente como Chapalote por parte del banco de germoplasma de CIMMYT (información de pasaporte), cumplieron estrictamente con las características físicas de esta raza (Figura 8).

Seis poblaciones (Pob3, Pob5, Pob10, Pob13, Pob17 y Pob18) se mostraron físicamente diferentes de aquellas con características exclusivas de Chapalote, particularmente la población 5 tiene rasgos mayormente similares a la raza elotero de Sinaloa o reventador negro, tanto por su tamaño de mazorca, como por su diámetro y principalmente el color del grano.

Los análisis de varianza realizados a los datos agromorfológicos obtenidos nos indican que las poblaciones de Chapalote analizadas en este estudio se diferencian significativamente entre ellas para las variables relacionadas con caracteres vegetativos, caracteres de la mazorca, caracteres de espiga, de grano y rendimiento de grano, esto dado que se encontraron diferencias estadísticas entre poblaciones para las 17 variables de respuesta estudiadas (Tabla 2).

También se verificó si existía alguna diferencia estadísticamente significativa entre los ambientes o localidades utilizadas en el estudio, dando como resultado positivo sobre la influencia de este factor en 10 de las 17 variables (altura de mazorca, altura de planta, número de hojas arriba de la mazorca, número de hojas bajo la mazorca, longitud de espiga, número de espiguillas, longitud de mazorca, peso de olote, longitud de grano y peso de grano).

Variables	Cuadrados medios				
	Localidad	Población	Repetición	Pob x loc	Error
Caracteres vegetativos					
Altura de mazorca (cm)	56022.18**	8899.86**	1709.08*	3073.78**	429.37
Altura de planta (cm)	35252.27**	18926.69**	14899.82**	3565.90**	935.3
Número de hojas arriba de la mazorca	30.64**	5.07**	0.12 ns	1.57*	0.66
Número de hojas bajo la mazorca	39.53**	16.75**	0.00 ns	7.36**	1.13
Caracteres de espiga					
Longitud de espiga (cm)	1899.28**	590.47**	350.45 ns	339.90**	108.51
Número de espiguillas	403.22**	285.84**	292.37*	123.47**	20.35
Caracteres de mazorca					
Número de hileras en la mazorca	21.77*	66.54**	6.36 ns	7.70*	3.68
Peso de mazorca (g)	3922.30 ns	63887.42**	8441.10*	5913.88**	1928.3
Longitud de mazorca (cm)	394.47**	98.93**	18.66 ns	18.07*	8.11
Diámetro de mazorca (mm)	26.81 ns	1229.72**	19.78 ns	231.69**	18.68
Peso de olote (g)	1645.35**	1112.39**	450.86*	177.78**	66.47
Diámetro de olote (mm)	90.11*	290.62**	41.43 ns	43.45**	13
Caracteres de grano					
Grosor de grano (mm)	221.97*	356.50**	169.61 ns	111.26**	42.55
Ancho de grano (mm)	669.40*	3611.81**	28.34 ns	345.45**	114.11
Longitud de grano (mm)	2452.19**	9434.02**	1007.76*	612.89**	146.9
Peso de grano (g)	1840.29**	2683.96**	435.01*	136.86**	50.21
Caracteres de productividad					
Rendimiento de grano por mazorca	11228.5*	49930.03**	5267.60 ns	4907.35**	1522.4

* = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$ ns = no significativo

Tabla 2: Resultados de los cuadrados medios de efectos para las 17 variables de estudio en las 18 poblaciones de interés.

Análisis de comparación de medias.

El análisis de comparación de medias utilizando la metodología de Tukey, se realizó en el programa JMP, el cual facilitó en gran medida el manejo de los datos obtenidos de la caracterización agromorfológica debido a que abarcaba todos los temas de la estadística, control de calidad estadística, confiabilidad y diseño de experimentos.

Al analizar el comportamiento de los resultados de las variables vegetativas, se observó que las poblaciones 17, 298 y 35 son las que poseen los mayores promedios, principalmente en los caracteres de altura de planta y altura de mazorca con valores de 288cm, 250cm y 295cm (altura de planta) y 144 cm, 132cm y 112cm (altura de

mazorca) respectivamente, siendo las dos últimas (pob-298 y pob-35) poblaciones testigo. Pob. 17 clasificada como Chapalote previamente, no presentó rasgos fenotípicos coincidentes con la preclasificación de un individuo de esta raza. Mientras que aquellas que se catalogaron en este estudio como pertenecientes a la raza, tienen promedios muy bajos en sus variables vegetativas (Figura 9).

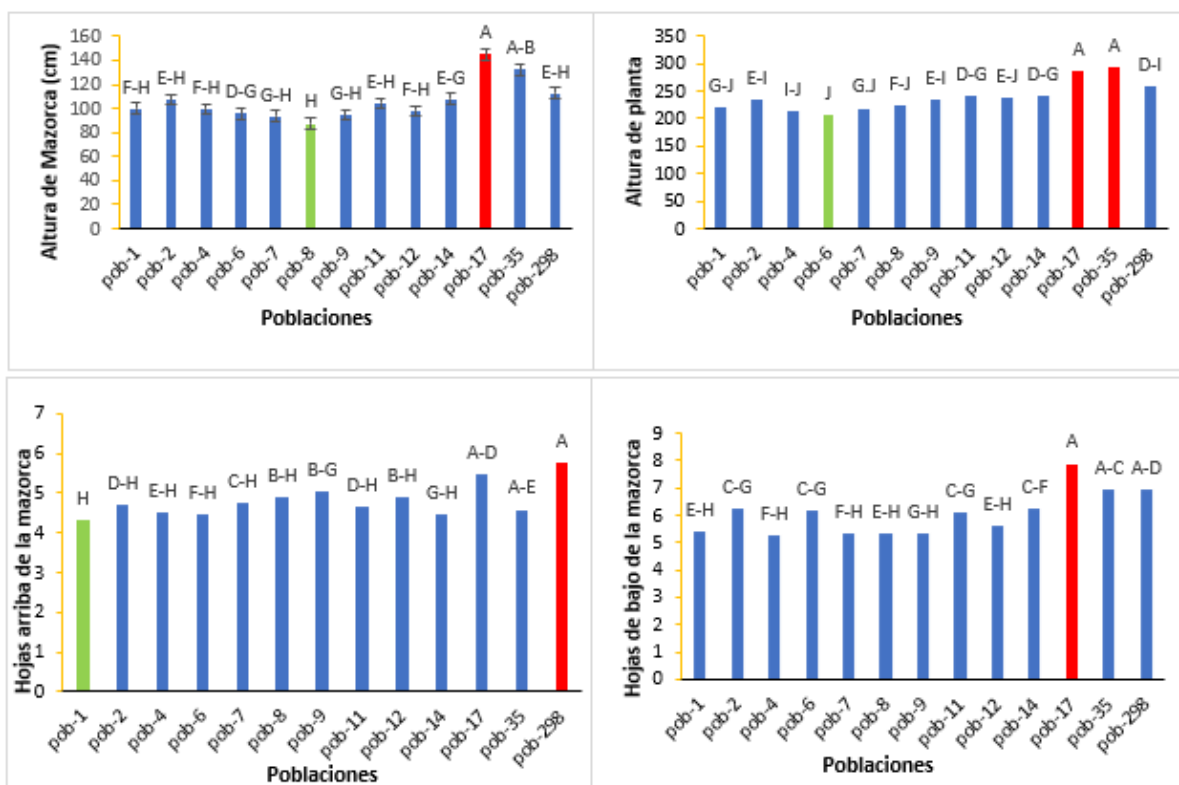


Figura 9: Comparación de medias de las variables vegetativas, donde se encuentran los caracteres altura de planta (cm), altura de mazorca (cm), numero de hojas arriba y numero de hojas bajo la mazorca. Medias con letras distintas en cada medición indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$) señalando de color verde la población con la media más baja y con rojo la población que obtuvo la media más alta.

La medición del comportamiento de las medias pertenecientes a la categoría de variables de espiga nos arrojó resultados similares a los mostrados por las variables vegetativas, ya que siguen predominando la población 17 y la población 35 con los promedios más altos en los caracteres de espiga obtenidos (56cm y 55cm respectivamente) (Figura 10).

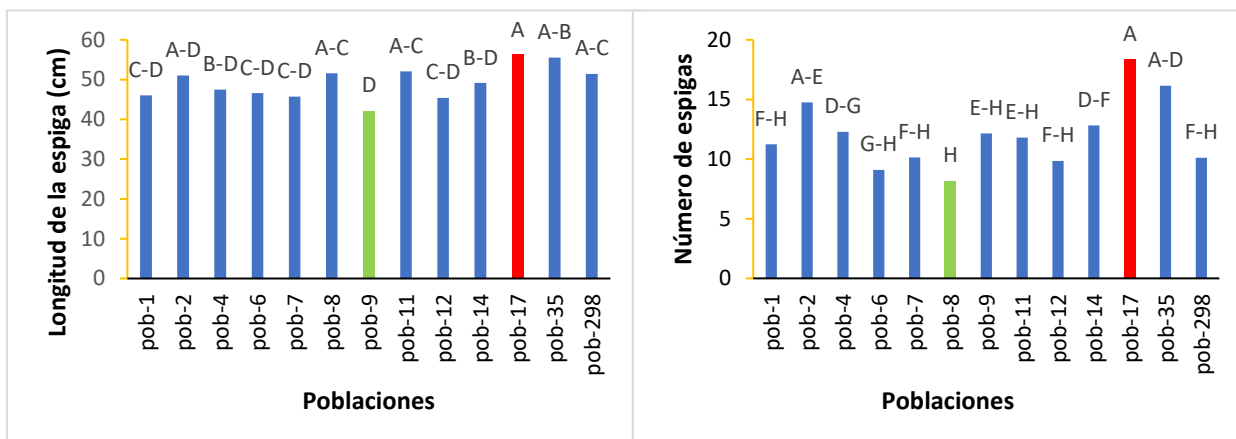


Figura 10: Comparación de medias de las variables de espiga, donde se encuentran los caracteres de longitud de espiga y número de espiguillas. Medias con letras distintas en cada medición indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos en relación con las variables de mazorca nos mostraron datos muy interesantes, ya que el promedio más bajo de estos caracteres fue siempre expresado por alguna de las poblaciones clasificadas inicialmente como Chapalote. Por ejemplo, en las variables de peso de mazorca y diámetro de esta, la población con la media más baja fue la número 7 con 72 grs. de peso y 29 mm de diámetro, cumpliendo con la mayoría, si no es que todos, los caracteres fenotípicos de la raza nativa en cuestión. Mientras que, para las variables de peso de olote y diámetro de olote, la población que predominó con los promedios más bajos fue la pob-4 (13 grs de peso y 19 mm de diámetro respectivamente), preclasificada también como Chapalote por el Banco de Germoplasma (Figura 11).

Al analizar los datos obtenidos para las variables de categoría de variables de grano, pudimos observar que las poblaciones testigos (pob-35 y pob-298) presentaron los promedios más altos en esta categoría. Así pob. 35 clasificada como elotero de Sinaloa manifestó las medias más altas en 3 de las 4 variables evaluadas (Figura 12).

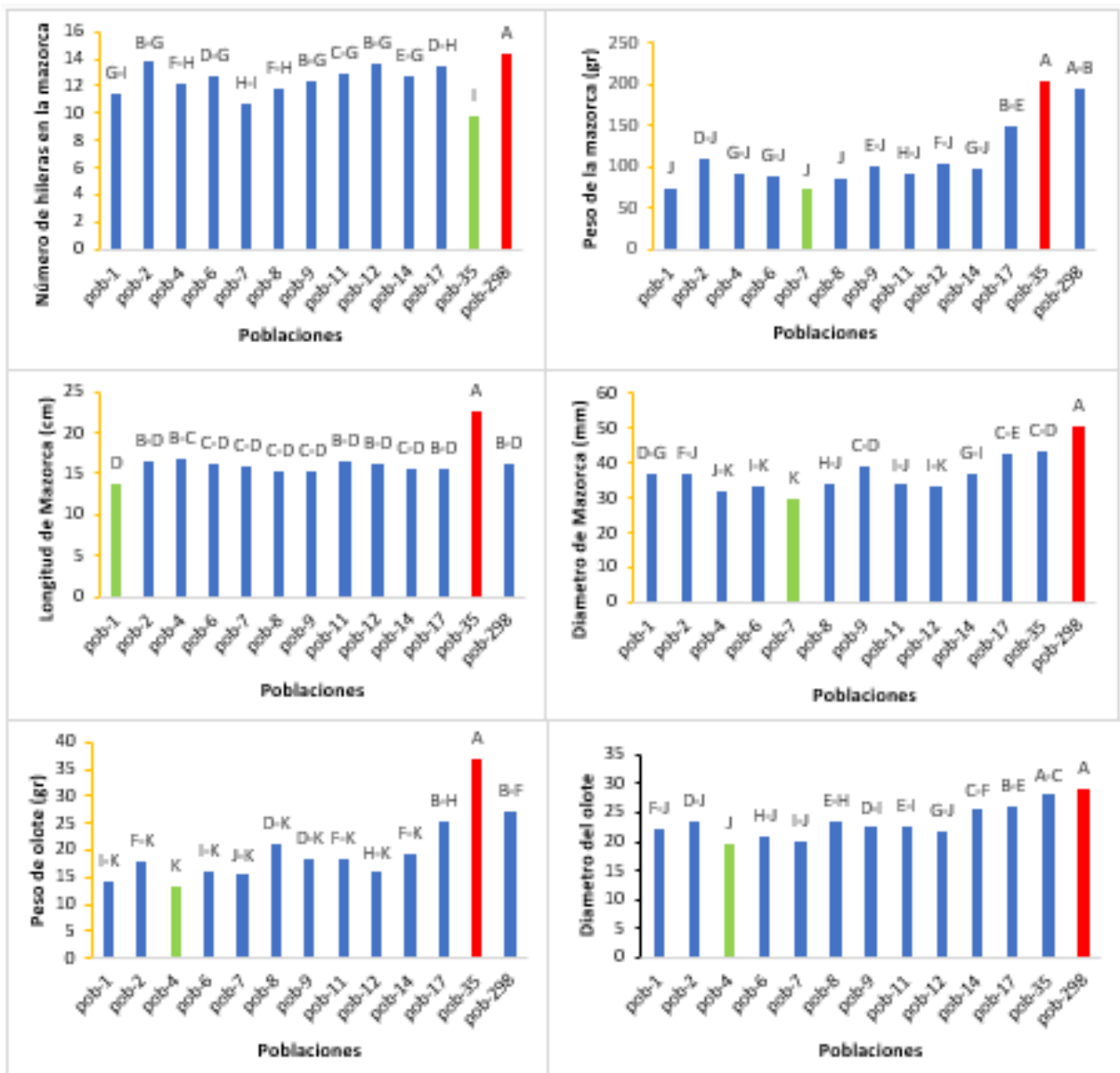


Figura 11: Comparación de medias de las variables de mazorca: número de hileras, peso, longitud y diámetro de mazorca, así como peso y diámetro del olote. Medias con letras distintas en cada medición indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

Por último, la categoría que se analizó al final de todas y de las más importantes para poder concluir con los resultados, fue la de productividad, en la cual se encontraba la variable de rendimiento de grano por mazorca (Figura 13).

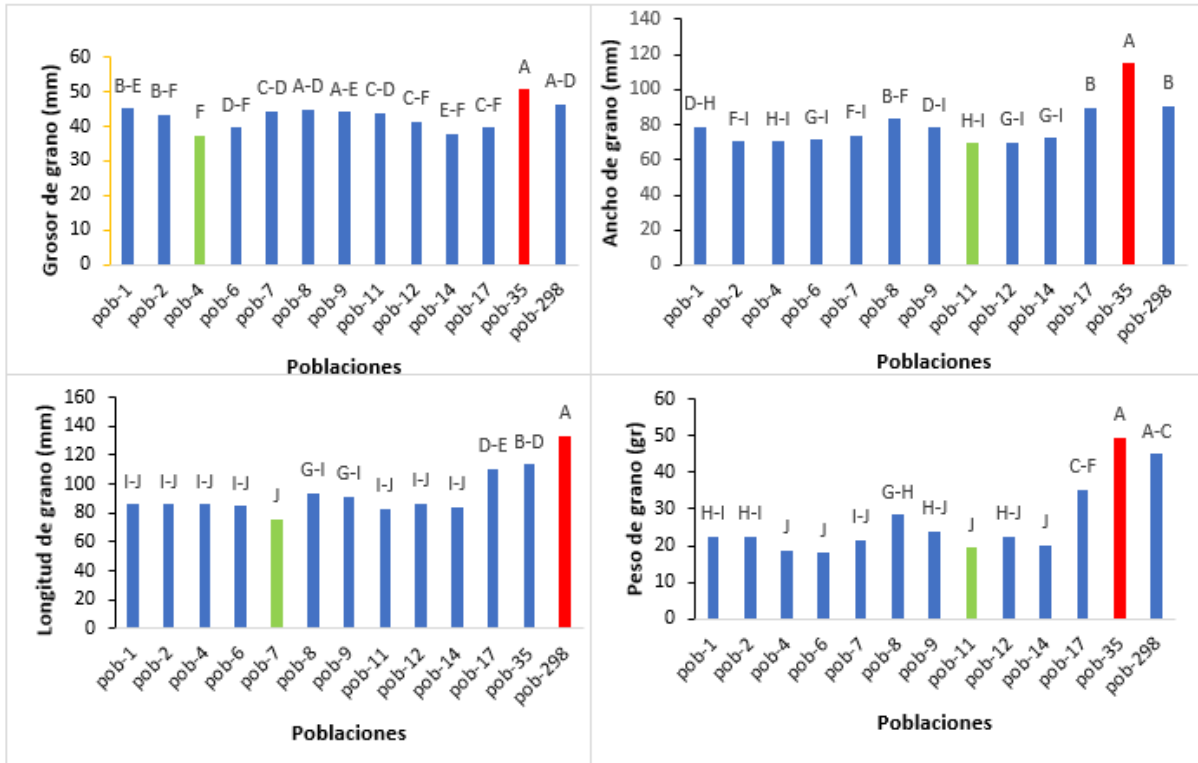


Figura 12: Comparación de medias de las variables de grano: Longitud de grano (mm), peso de grano (grs), grosor de grano (mm), longitud de grano (mm) y ancho de grano (mm). Medias con letras distintas en cada medición indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

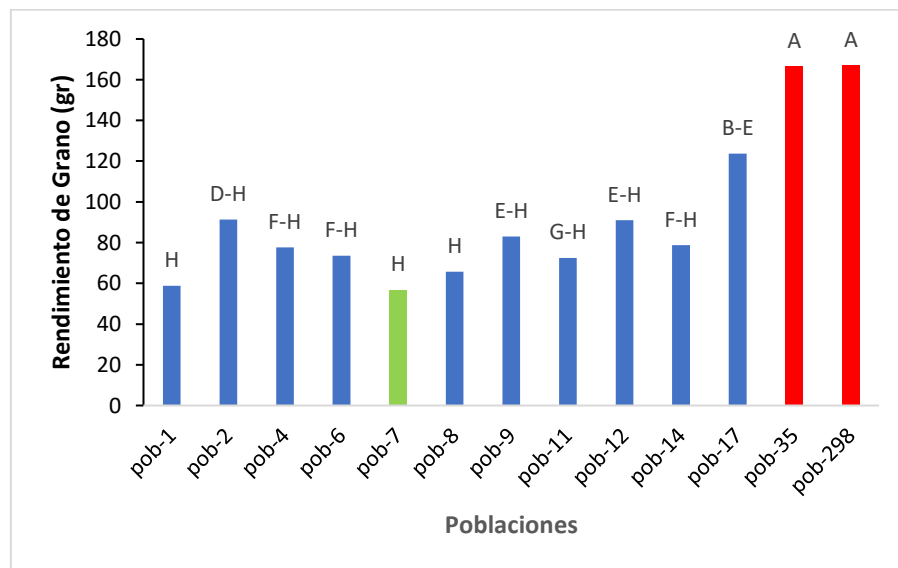


Figura 13: Comparación de medias de la variable rendimiento de grano (grs). Medias con letras distintas en cada medición indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

Como se puede observar en la Figura 13, tenemos como resultado que la población con el promedio más bajo en el carácter de productividad del grano es la número 7, esto era de esperarse ya que, al analizar las variables de mazorca, dicha población era la que tenía menor peso y el diámetro de sus mazorcas fue el más pequeño. Seguida como se observa por la población 1, quien, a lo largo de los análisis de la comparación de medias en cada una de las variables procesadas, siguió en su mayoría el mismo comportamiento que la 7.

Análisis de conglomerados de datos agromorfológicos.

El análisis de conglomerados dio como resultado la diferenciación de 3 grupos muy bien definidos, Grupo I, II y III, formados por 12, 8 y 5 poblaciones respectivamente.

El grupo I se formó por todas las poblaciones que cumplen con las características físicas típicas de la raza de maíz Chapalote; Población 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, además de la población 16 y una de las poblaciones testigo (población 271).

El grupo II estuvo constituido por las poblaciones 3, 5, 10, 13, 15, 17, 18 y una de las poblaciones testigo 35, lo cual es congruente con lo esperado ya que tanto esta población como la población número 5 de los 18 originales, tienen el aspecto físico de la raza Elotero de Sinaloa.

El grupo número III se conformó por las 5 poblaciones testigo restantes, lo cual es muy oportuno de acuerdo con lo que se esperaba puesto que estas 5 poblaciones (296, 297, 298, 299 y 300) pertenecen al grupo de Tuxpeño.

Agglomerative Coefficient = 0.67

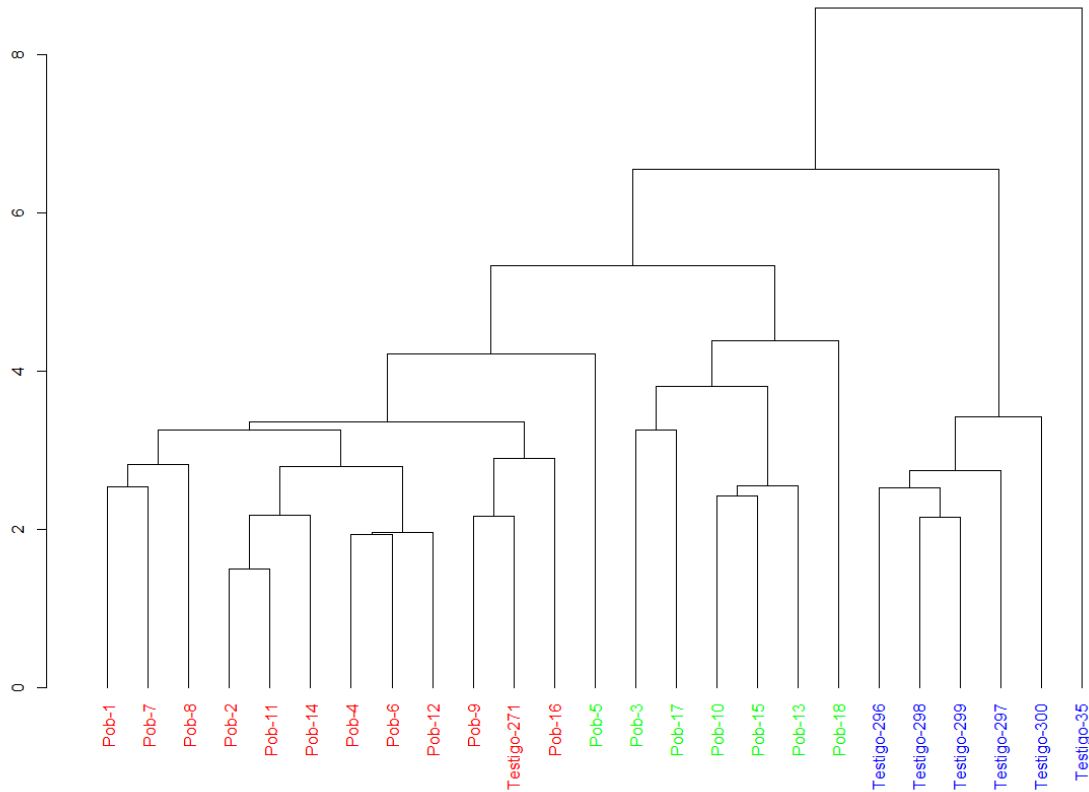


Figura 14: Dendrograma de las 18 poblaciones analizadas en este estudio más las poblaciones testigo. De color rojo se distingue las poblaciones del grupo I, de color verde las pertenecientes al grupo II y finalmente de color azul se distingue al grupo número III.

Control de calidad y selección de los marcadores

Un total de 109,298 marcadores moleculares codominantes, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), fueron reconocidos y denominados con éxito dentro del conjunto de datos obtenidos a partir de las 18 colecciones evaluadas en este estudio.

Estos SNPs fueron condicionados a cumplir con ciertos requisitos en relación con algunas características cualitativas. Para ello, un proceso de filtrado de calidad de datos fue aplicado eliminándose en primera instancia todos los marcadores monomórficos.

Al mismo tiempo, se observó la tasa de llamada de los SNPs y la reproducibilidad o consenso entre los datos generados para una muestra y su réplica técnica, descartando aquellos marcadores que no cumplieran con al menos el 70% de datos existentes para cada marcador en el conjunto de muestras evaluadas, y el 95% de reproducibilidad.

Finalmente fueron descartados también aquellos marcadores que presentaron una menor frecuencia alélica (MFA) del 5 % o mayor al 95%.

Estas exigencias eliminaron un 74% de los marcadores totales, dejando sólo aquellos que mostraron la calidad necesaria para cumplir con los objetivos de nuestro análisis.

Así, se seleccionó un total de 28, 317 SNPs de excelente calidad, los que fueron calificados como los más informativos para poder llevar a cabo este estudio de diversidad genética.

En la Tabla 3 se muestra el número exacto de marcadores eliminados por cada uno de los parámetros de filtrado anteriormente mencionados y aplicados al número inicial de marcadores.

<i>Parámetros de filtrado de los marcadores</i>	<i>Número de marcadores</i>
<i>Número inicial de marcadores</i>	109,298
<i>Proporción de datos monomórficos</i>	4,312
<i>- Marcadores con reproducibilidad < 0.97</i>	30,847
<i>- Marcadores con MFA < 0.95 - > 0.05</i>	45,822
<i>Número final de marcadores</i>	28,317

Tabla 3: Parámetros aplicados para el proceso de filtrado de calidad de los SNPs y el número de marcadores eliminados a partir de la aplicación de cada uno de ellos.

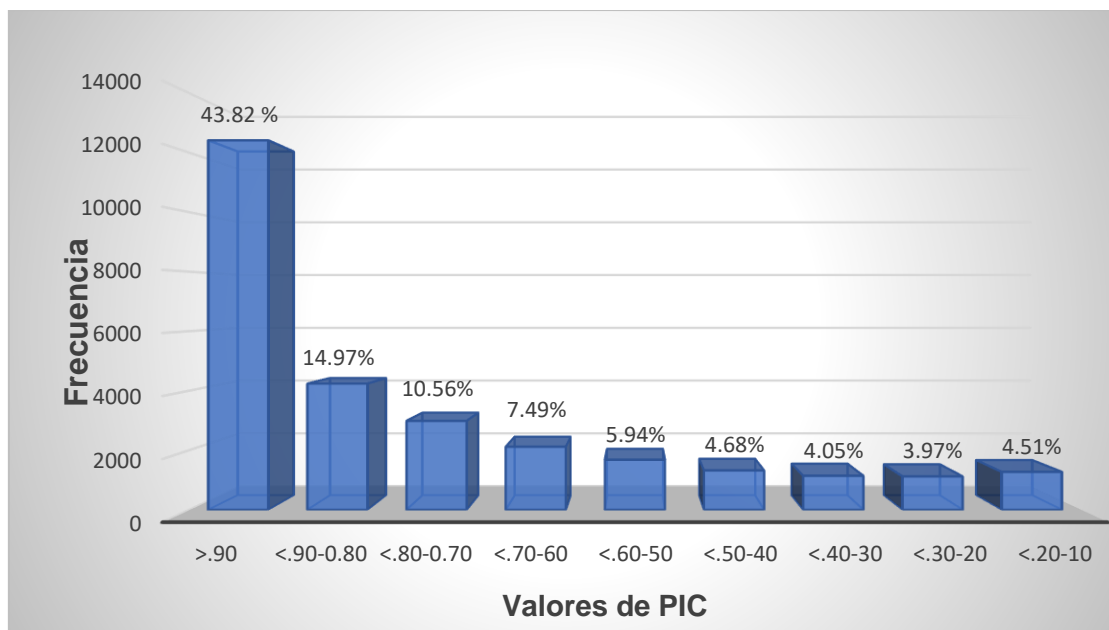


Figura 15: Distribución de frecuencia del contenido de información polimórfica (PIC) de los SNPs obtenidos en este estudio.

Los marcadores SNPs mostraron una amplitud en los valores de contenido de información polimórfica (PIC) de entre 0.10 y 0.99 (Figura 15). Este parámetro es importante, ya que indica el valor relativo de cada marcador con respecto a la cantidad de polimorfismo exhibido.

El valor promedio de PIC encontrado en este estudio fue de 0.73, manteniéndose por encima de 0.09 como valor mínimo encontrado. Así, el mayor porcentaje de los SNPs identificados (43.82%) tuvo valores altos de contenido polimórfico (PIC >0.99), mientras que el segundo mayor porcentaje de estos (~15%) también se mantuvo en un rango alto de PIC (<0.90-80), siendo que solo el 12.53% de los SNPs presentó un PIC menor a 0.5. Por lo tanto, los marcadores obtenidos en este trabajo son considerados como informativos para poder llevar a cabo un análisis de diversidad genética de manera confiable.

Análisis de conglomerados

El análisis de conglomerados basado en el método de Ward (Ward, 1963), utilizando la distancia genética de Rogers (Wright, 1978).

La Figura 16 presenta un dendrograma donde se distinguen claramente dos grandes grupos, el grupo I con 6 de las 9 poblaciones que se agregaron al análisis como muestras testigo y grupo II, en donde se encuentran 17 de las 18 poblaciones de interés (esto debido a que la población 1 (SINA 2) fue descartada en el proceso de secuenciación debido a que no pasó el filtrado de calidad en el proceso de amplificación de fragmentos). A este grupo (II) se le suman las 3 poblaciones testigo restantes pertenecientes a la raza reventador. Se esperaba que la raza reventador se agrupara con las accesiones de interés ya que tanto la primera, como la segunda comparten grupo en su clasificación general, ambas pertenecientes al grupo de los Chapalote.

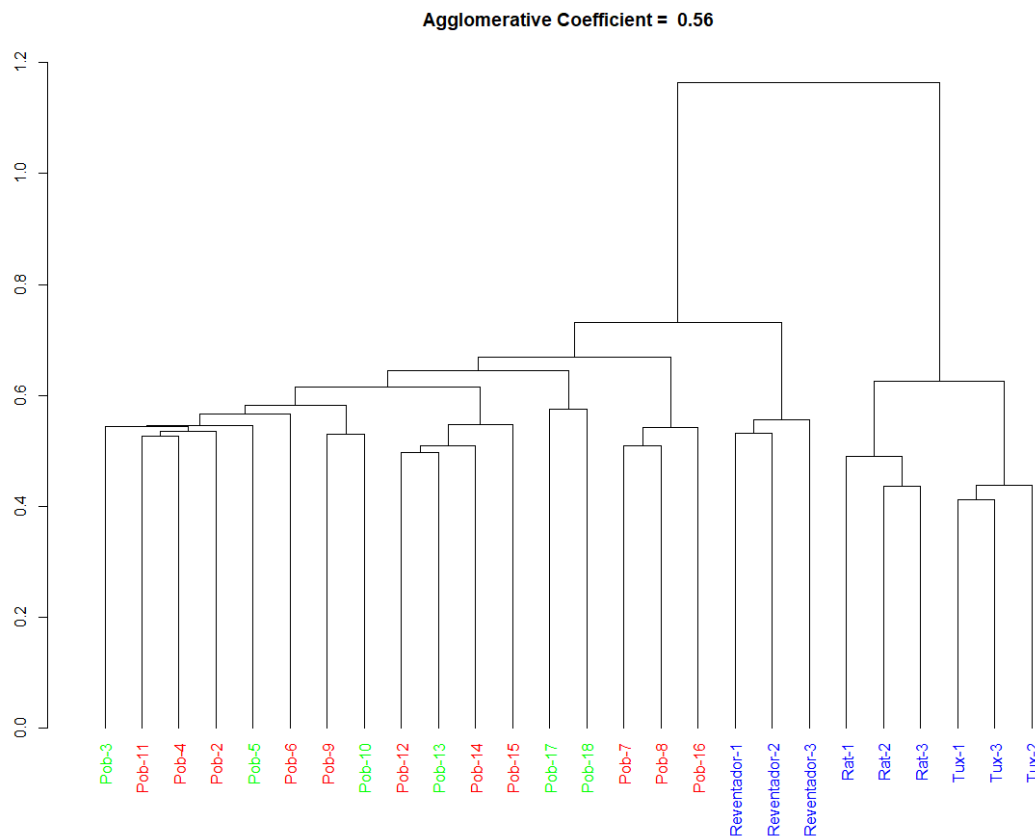


Figura 16: Dendrograma jerárquico de las distancias genéticas entre las 18 poblaciones de interés en el estudio, mas 9 poblaciones utilizadas como testigo para este análisis. Pob-1 a Pob-18 identifican a cada población registrada como Chapalote, de color rojo identificadas aquellas que tienen el aspecto físico propio de la raza, y de color verde aquellas que no cumplen con este criterio. (Tux1-3) son muestras de la raza tuxpeño utilizadas como testigos, al igual que la raza ratón (Rat1-3) y la raza reventador (1-3).

Otro estudio realizado con datos genotípicos obtenidos fue la realización del análisis de varianza molecular (AMOVA). Como se puede observar en la Tabla 4, la mayor fuente de variabilidad se encontró dentro de las poblaciones (92.9%) y no entre ellas (7.09%), dándonos como resultado, que las 18 poblaciones de interés en el estudio, no presentan diferencias genotípicas significativas entre sí dado que el valor de la prueba de hipótesis de diferenciación entre poblaciones es $\phi=0.07$ un valor pequeño, indicándonos que pese a que algunas de las poblaciones son consideradas como mezcla de dos razas, la raza Chapalote tiene mucha influencia en su comportamiento genotípico, ya que estos materiales no se separan genéticamente de aquellos que son clasificados como Chapalote de raza pura.

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Pr \geq F	% Variabilidad	Phi
Entre grupos	2	0.2552	0.0005	7.0956	0.0709
Dentro de grupos	23	1.7661		92.9044	
Total	25	2.0214		100	

Tabla 4: Análisis de varianza molecular (AMOVA) de las 18 poblaciones de interés.

En la Figura 17 se observa el comportamiento por pares de genotipo pertenecientes a Chapalote (puntos rojos) estos tienen valores más bajos comparados con el par donde se incluye un genotipo de Chapalote y un genotipo de material con características físicas distintas a esta raza (puntos amarillos); y con el par de genotipos donde ambos pertenecen a materiales con características físicas distintas (puntos verdes).

No se encuentra una correlación clara entre las distancias genéticas y agromorfológicas ($r^2=0.173$), lo que nos confirma las discrepancias entre las agrupaciones encontradas con las características físicas típicas de la raza Chapalote, las cuales, son diferentes a las agrupaciones obtenidas mediante los análisis genéticos.

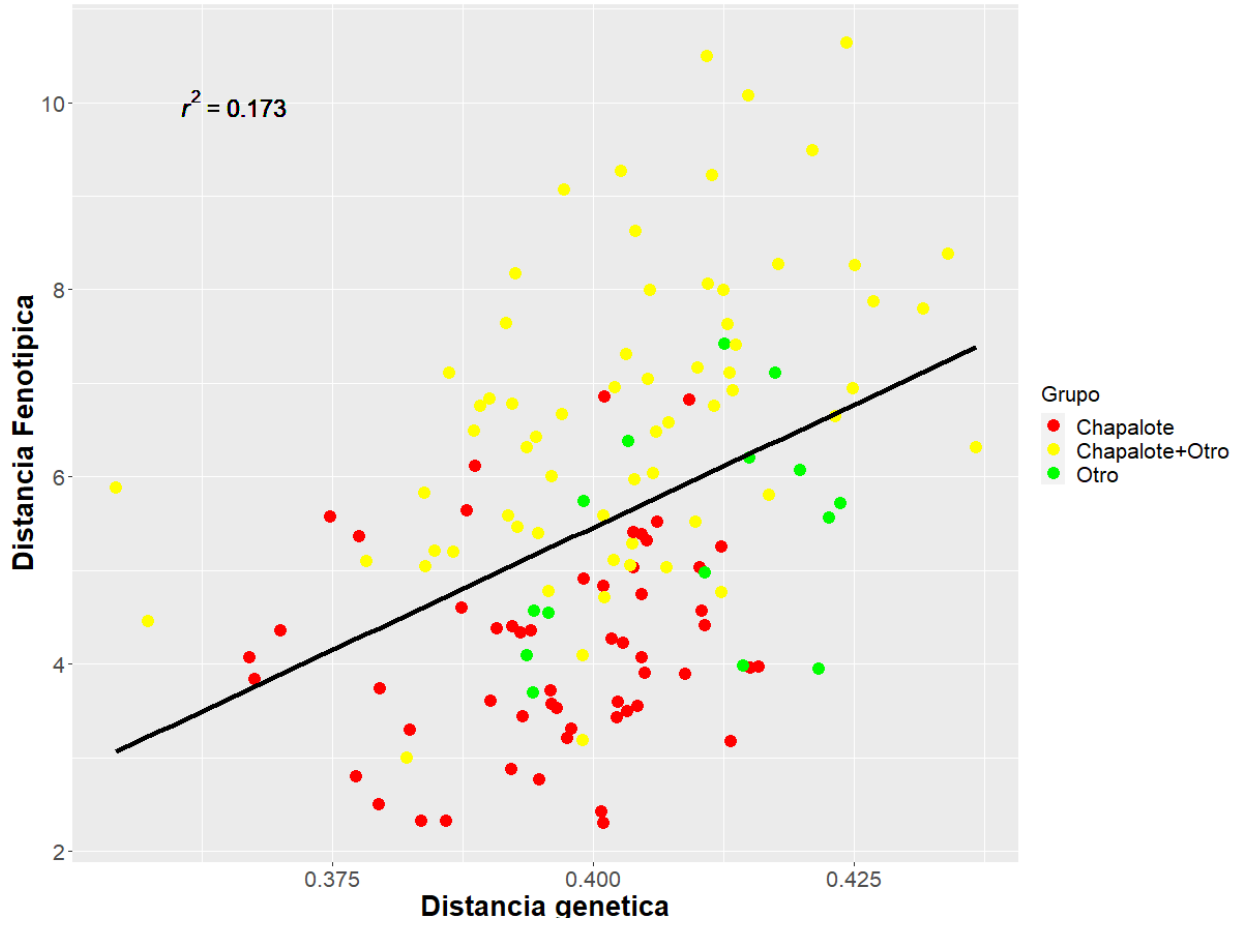


Figura 17: Análisis de correlación entre distancias genéticas y fenotípicas de las 18 poblaciones de interés.

VII. DISCUSIONES

El valor promedio del PIC obtenido en este estudio fue del 0.73 esto fue notablemente superior al obtenido por Zhang *et. al.* (2016), reportaron un valor de PIC mayor a 0.35. al estudiar la diversidad genética en 10 razas nativas de maíz. De esto se deduce que los marcadores identificados en el estudio son polimórficos, confiables e igualmente informativos que los SNPs reportados en las publicaciones mencionadas.

Las relaciones genéticas entre las muestras de la raza Chapalote y aquella que estaba clasificada como raza Reventador, estuvieron relacionadas básicamente a patrones altitudinales y geográfico ya que como lo menciona Ruiz *et. al.* 2008, ambas razas comparten características de adaptación a climas semicálidos, de 20-27 °C con 500-870 mm. de precipitación. Además de que ambas razas, como se menciona en el apartado de antecedentes, pertenecen efectivamente al grupo de los Chapalotes (CONABIO, 2011), (Sánchez, 2011), (Wellhausen *et al.* 1951). Lo que explica que genéticamente tengan más cercanía en el análisis de conglomerado de datos genéticos, que las otras de razas utilizadas como testigo (Tuxpeño y Ratón). Estos resultados coinciden con lo reportado por Barrera-Solano (2020) donde analizaron 54 muestras representativas de razas mexicanas de maíz caracterizadas con diez marcadores moleculares ISSR.

Wellhausen *et. al.* (1952) y más tarde Vega-Álvarez *et. al.* (2017) mencionan que estudios basados en características morfológicas indican que algunas de las variedades locales surgen de la hibridación de otras razas. Se considera que Chapalote y Reventador, mediante la intervención de Teocinte, dieron lugar a otras razas o introgresaron características propias (mazorcas elípticas, coloraciones de grano) a razas similares en el noroeste de México (Wellhausen *et al.* 1951).

Resultados similares a los de esta investigación son reportados por Rocandio-Rodríguez *et. al.* (2014), en un estudio de caracterización morfológica y agronómica de siete razas de maíz de los Valles Altos de México, donde confirmaron que los

agrupamientos e interrelaciones raciales son más precisos, si se utilizan testigos con características morfológicas totalmente contrastantes.

En este estudio, las accesiones que contenían dos componentes raciales pudieron expresar fenotípicamente las características de una sola raza, aunque genéticamente no se refleja su pertenencia total a la raza expresada, esto coincide con lo reportado por Linares-Holguín (2019) al realizar caracterización de maíces nativos del Estado de Sinaloa. Aunque fenotípicamente se expresó la raza distinta a Chapalote (Reventador o Tuxpeño), genéticamente siguen estando relacionados y agrupados con aquellos Chapalote de raza pura.

En otro estudio se determinó que, si el flujo génico entre las razas mexicanas de maíz analizadas era bajo, se presenta diferenciación genética entre las poblaciones; y de ser alto, se promueve la homogeneidad genética de dichas poblaciones (Barrera *et. al* 2020). Esto quedó demostrado con el AMOVA realizado en este estudio, donde se utilizaron testigos sin flujo génico con las poblaciones de interés.

Los resultados de germinación mostraron que la raza Chapalote sigue siendo una de las razas que posee potencial para ser considerada como resistente, con gran porcentaje de adaptabilidad y mayor poder germinativo, esto quedó demostrado ya que aquellas que no estaban consideradas como raza pura de Chapalote, según sus datos de pasaporte, se vieron afectadas en el proceso de germinación y la mayoría de las plantas que lograron germinar y desarrollarse, su mazorca fue deficiente (pequeña, con ausencia de grano). Esto coincide con lo obtenido por Ruiz-Corral *et. al.* (2011) en el estudio realizado a razas mexicanas de maíz como fuente de germoplasma para la adaptación al cambio climático, en donde logró caracterizar a la raza Chapalote como raza rústica, debido a que se desarrolla en las condiciones más adversas tanto de temperatura como de humedad.

Las evidencias mostradas en este estudio nos indica que Chapalote se puede considerar como una fuente de potencial de germoplasma para proyectos de premejoramiento, puesto que en ella podemos explotar características de importancia

agronómica que nos ayudarían a generar líneas de mayor resistencia o adaptabilidad. Esta estrategia fue recomendada también por Vázquez-Carrillo et. al (2003) por sus resultados en el estudio de calidad de grano y tortillas de maíces criollos y sus retrocruzas, donde se pudo observar que la raza Chapalote es de las pocas razas que cumple con el requerimiento de la industria de harina nixtamalizada por sus optimas características de grano.

Las diferencias mostradas en el agrupamiento y distanciamiento entre poblaciones en los dos tipos de caracterización realizada en este estudio (agromorfológica y genotípica) se deben principalmente a que, a nivel fenotipo, los marcadores morfológicos o la expresión de las características físicas, puede ser afectada por factores ambientales, mientras que a nivel molecular o de DNA, se define un agrupamiento genético completo (Govindaraj et. al. 2015).

VIII. CONCLUSIONES

Tomando en consideración las 18 principales poblaciones evaluadas en este estudio, podríamos concluir que, de estas únicamente 12 de ellas cumplen con las características físicas propias de esta raza de maíz nativo.

El darle un valor agronómico a la raza Chapalote nos permitirá tener alternativas que ayuden a su conservación, misma que es necesario promover, ya que ayudará a mantener el acervo genético disponible, así como la conservación de la diversidad genética presente en los maíces del Estado de Sinaloa.

La diversidad registrada en este estudio, en cierta forma, es una evidencia que contribuye a ilustrar la riqueza que contienen las poblaciones de maíces que se encuentran resguardadas en el Banco de Germoplasma de CIMMYT. De alguna manera este estudio nos servirá para hacer una recomendación al Banco de Germoplasma para la implementación de un control de calidad que esté complementado con datos agromorfológicos y genotípicos para comprobar la pureza de las líneas clasificadas como raza pura.

Bibliografía

- Aceves. (2002). Comportamiento agronómico del híbrido H-137 y materiales criollos de maíz en el Valle de Puebla. . *Rev. Fitotec. Mex.* , 25:339-347. .
- Adame, e. a. (2016). Variabilidad genética y asociación morfológica entre poblaciones nativas de maíz y sus cruza F1. *Rev. Mex. Cienc. Agríc vol.7 no.8 Texcoco nov./dic.* .
- Akkaya, M., & Bhagwat, A. A. (1992). Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132:1131-1139.
- Brondani, R. C., & Tarchini, R. a. (1998). Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theor. Appl. Genet.* 97:816-827.
- Bye Boettler, K. Y. (2009). *ORIGEN Y DIVERSIFICACION DEL MAÍZ*. Derechos reservados de la primera edición, Comisión Nacional para el Conocimiento de la Biodiversidad.
- Castro-Nava. (2011). Preliminary field screening of maize landrace germplasm from northeastern México under high temperatures. *Maydica.* 56:77-82.
- Cervantes, Y. F. (2016). Variabilidad genética y asociación morfológica entre poblaciones nativas de maíz y sus cruza F1. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Vol.7*, p. 1919-1931.
- CIMMYT. (1991). *CIMMYT. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. 2012*. El maíz (consultado en Diciembre 2021).
- Colwin, T., Vos, P., Zabeau, M., Jones, D., Norcott, K., & Chadwick, B. a. (1995). Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *The Pl.*
- CONABIO. (2010). Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de los maíces y sus parientes silvestres.
- Cutler-Anderson. (1942). *Races of Zea Mays: I. Their Recognition and Classification*. Missouri: Annals of the Missouri Botanical Garden. 1942 (tDAR id: 111757).
- Damania. (2008). History, achievements, and current status of genetic resources conservation. . *Agron. J.* 100:9-21.
- Demeke-Adams, R. a. (1992). Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in Brassica. *Theor Appl Genet.* 84 :990-994.
- Doebley. (1990). Molecular evidence and the evolution of maize. . *Econ. Bot.* 44 (3 supplement):, 6- 27.
- Doebley-Wendel. (1989). Application of RFLPs to plant systematics. In : Helentjarus, T.; Barr, B. (Eds.) *Development and application of molecular markers to problems in plant genetics*. New York, U.S.A. Cold Spring Harbor Laboratories. p.57-67.
- Esquivel, D. I. (2011). Utilización de poblaciones nativas de maíz en programas de premejoramiento. *Sociedad Mexicana de Fitogenética A.C Chapingo México*, pp 43-58.
- Ferreira&Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1 ed. Brasilia, EMBRAPA-CENARGEN, documento . 20. pp 220.
- Foolad, M., Arulsekar, S., & Becerra, V. a. (1995). A genetic map of *Prunus* based on an interspecific cross between peach and almond. *Theor. Appl. Genet.* 91 :262-269.
- Freeland, J. (2005). The evolution of population biology: past, present and future.
- Galinat, W. (1995). El origen del maíz: el grano de la humanidad. *Econ. Bot*, 49(1):3-12.

- Gil López, M. O.-S. (2004). Variedades criollas de maíz (*Zea mays* L.) en el Estado de Puebla, México: diversidad y utilización. In: Manejo de la Diversidad de los Cultivos en los Agroecosistemas Tradicionales. *Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Cali, Colombia.*, pp:18-25.
- Herrera-Ortega. (2004). Caracteres morfológicos para valorar la diversidad entre poblaciones de maíz en una región: caso la raza Chalqueño. *Rev. Fitotec. Mex.*, 23:335–354.
- Hugh, H. (2000). “Homeotic Sexual Translocations and the Origin of Maize (*Zea mays*, Poaceae): A New Look at an Old Problem. *Economic Botany* 54, no. 1, 22, 29-35.
- Jarvis. (2008). Simple sequence repeat marker development and genetic mapping in maize. *Journal of Genetics*, p. 39–51.
- Kato. (2009). Origen y Diversificación del Maíz: Una Revisión Analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Uso y Conocimiento de la Biodiversidad. *Editorial Impresora Apolo, S.A.*
- Katzir, N., Danin-Poleg, Y., Tzuri, G., Karchi, Z., & Lavi, U. a. (1996). Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. *Theor. Appl. Genet.* 93 :1282-1290.
- Lasso, M. G. (2010). *Caracterización molecular de la colección nacional de camote (Ipomoea spp.) del banco nacional de germoplasma del INIAP mediante marcadores microsatélites.*
- Luna, M. F. (1993). Mejoramiento genético de maíz para condiciones adversas. En L. F. M. Zapopan, Jalisco.
- Mazzinelli-Valoti. (2009). Characterization of maize germplasm for the chemical composition of the grain. *Agric. Food Chem*, 57:2378-2384.
- Mera-Ovando. (2009). Aspectos socioeconómicos y culturales. In: Origen y Diversificación del Maíz: Una Revisión Analítica. . *Universidad Nacional Autónoma de México.*
- Miranda-Colín. (2000). Mejoramiento genético del maíz en la época prehispánica. *Agric. Téc. Méx.* 26:3-15.
- Ortega, G. O. (2011). Situación actual de los maíces nativos y sus parientes silvestres en México. *Sociedad Mexicana de Fitotecnia*, 75-84.
- Ortega-Coutiño. (2008). Persistencia de los maíces nativos en Sonora. *III Reunión nacional para el mejoramiento, conservación y uso de maíces criollos*, (pág. 86). Celaya, Guanajuato.
- Ortega-Guerrero. (2013). Diversidad y distribución de los maíces nativos de México.
- Petroli, C. D. (2013). Genotipificación por Secuenciación. *Enlace CIMMYT.*
- Preciado Ortiz, M. H. (2011). *Amplitud, Mejoramiento, Usos y Riesgos de la Diversidad Genética del Maíz en México.* Estado de México: Sociedad Mexicana de Fitogenética A.C. Chapingo.
- Radović, G. (2000). *Local maize germplasm. Potentially valuable breeding materia.*
- Reif. (2004). Genetic diversity determined within and among CIMMYT maize populations of tropical, subtropical, and temperate germplasm by SSR marker.
- Roberts. (1950). *Las razas mexicanas de maíz mas utiles como material basico para mejoramiento.* Folleto Miscelane #3 pp71-84: Primera asamblea Latinoamericana de Fitogenetistas.
- Sánchez-Goodman. (2000). Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. 54:43-59.
- Sanger, F. (1989). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 74(12): 5463-5467.

- Serna-Saldívar. (2008). El papel de la tortilla nixtamalizada en la nutrición y la alimentación. In: Nixtamalización del Maíz a la Tortilla. Aspectos Nutrimientales y Toxicológicos.
- Sharma, S., & Knox, M. a. (1996). AFLP analysis of the diversity and phylogeny of lens and its comparison with RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 93 :751-758.
- Sherry-Ward. (2001). *the NCBI database of genetic variation. Nucleic Acids Res.* . <https://doi.org/10.1093/nar/29.1.308>: 29, 308-311.
- SIAP. (2019). *SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2019.* . Disponible en: <https://www.gob.mx/siap>.
- SIAP., 2. (16 de FEBRERO de 2012). *AGROBIO MEXICO* . Recuperado el 10 de MARZO de 2016, de AGROBIO MEXICO : http://www.agrobiomexico.org.mx/index.php?option=com_k2&view=item&layout=item&id=95&Itemid=29
- Smale, e. a. (2013). Genetic diversity in tropical mexican landraces of maize. . ISSN 0187-7380. *Rev. fitotec. mex [online]. 2013, vol.36, suppl., pp.239-338.*
- Smith. (2007). Pedigree pedigree background changes in U.S. hybrid maize between 1980 and 2004. *Crop Sci.* 47:1914-1926. .
- Tohme, J., González, O., & Beebe, S. a. (1996). AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Science* 36 :1375-1384.
- Toledo-Manzur. (2008). La Memoria Biocultural. La Importancia Ecológica de las Sabidurías Tradicionales. . *Icaria Editorial, S.A. Barcelona, España.* , 233 p.
- Turrent. (2010). ¿Es ventajosa para México la tecnología actual de maíz transgénico? *Rev. Mex. Cien. Agríc.* 1:631-646.
- Turrent-Fernández. (2012). Factibilidad de alcanzar el potencial productivo de maíz de México. . *Mex. Rural Develop. Res.*, Rep. 24:1-36. .
- Vielle-Calzada, J.-P. (2009). The Mexican Landraces: Description, Classification and Diversity. *Handbook of Maize: Its Biology* , pp 543-561.
- Vierling, R. a. (1992). Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid wheat genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 84 :835-838 Vigouroux, Y., Glaubitz, J. C., Matsuoka, Goodman, M. M., Sánchez, J., &
- Vigouroux Y, M. M. (2002). Identifying genes of agronomic importance in maize by screening microsatellites for evidence of selection during domestication. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99:9650-9655.
- Vigouroux, Y. (2008). Population structure and genetic diversity of New World maize races assessed by DNA microsatellites. *Oct;95(10):1240-53.* doi: 10.3732/ajb.0800097.
- Vos Hogers, B. M., Reijans, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., . . . :4407-4414, .. A. (1995). AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23 :4407-4414.
- Warburton. (2008). Genetic diversity in CIMMYT nontemperate maize germplasm: landraces, open pollinated varieties, and inbred lines. *Crop Sci.* 48:617-624.
- Wellhausen. (1951). Maíz en México, su Origen, Características y Distribución.
- Williams Kubelik, K. L. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535.