



UAEM

Universidad Autónoma
del Estado de México



Identificación de la diversidad morfológica y genética de variedades de maíz nativo *Zea mays* mediante microsatélites, dentro de la comunidad de Tlachichilpa Estado de México.

TESIS

Para obtener el grado de
Licenciada en Biotecnología

PRESENTA

Viridiana de la Cruz Peralta

Director

Dra. Leticia Buendía González

Director externo

Dr. Ángel Roberto Martínez Campos

Abril del 2018

ÍNDICE GENERAL.

Resumen

1. Introducción.....	7
2. Antecedentes.....	9
2.1 Maíz (<i>Zea mays</i>)	9
2.2 Gametogénesis y fertilización del maíz.....	10
2.3 Formación del grano.....	11
2.4 Alternancia de generaciones.....	11
2.5 Origen del maíz.....	11
2.6 Origen mexicano.....	12
2.7 Contexto económico del maíz.....	12
2.8 Clasificación del maíz.....	12
2.8.1 Clasificación de las razas de maíz en México.....	12
2.9 Siembra de maíz en el estado de México.....	13
2.9.1 Grupo cónico.....	13
2.10 Caracterización genética.....	14
2.10.1 Extracción y purificación de ADN genómico.....	14
2.10.2 Cuantificación de ADN mediante espectrofotometría.....	15
2.10.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	16
2.10.4 Electroforesis.....	17
2.11 Variabilidad Genética.....	19
2.12 Flujo génico.....	19
2.13 Marcadores moleculares.....	20
2.13.1 Microsatélites.....	20
2.13.2 RAPD.....	21
2.13.3 AFLP.....	22
2.13.4 Distancia genética.....	22

2.13.4.1 Distancia de Rogers.....	23
2.13.4.2 Distancia Euclidiana.....	23
2.13.4.3 Análisis de conglomerados UPGMA.....	23
2.14 Estudios en <i>Zea mays</i>	27
3. Objetivos.....	28
3.1 Objetivo general.....	28
3.2 Objetivos particulares.....	28
4. Hipótesis.....	29
5. Materiales y Método.....	30
5.1 Muestreo de variedades de mazorcas.....	30
5.2 Caracterización morfológica.....	30
5.3 Germinación aséptica de semillas.....	31
5.4 Extracción de ADN.....	31
5.5 Cuantificación y comprobación de la presencia de ADN por electroforesis.....	33
5.6 Amplificación de SSR.....	33
5.7 Análisis de microsatélites y construcción de dendrograma.....	36
5.8. Análisis estadístico.....	36
6. Resultados y Discusión.....	37
6.1 Caracterización morfológica.....	37
6.1.1 Dendrograma características morfológicas Tlachichilpa.....	38
6.1.2 Dendrograma características morfológicas Cerrillo.....	39
6.2 Análisis SSR's.....	40
6.2.1 Dendrograma Distancia genética Tlachichilpa.....	40

6.2.2 Dendrograma Distancia genética Cerrillo.....	43
7. Conclusiones.....	46
8. Recomendaciones.....	48
9. Referencias.....	49
10. ANEXOS.....	53

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición de mezcla para PCR.....	34
Cuadro 2. Marcadores SSR afines a variedades de maíz cónicas.....	34
Cuadro 3. Caracterización morfológica de muestras de mazorcas de maíz Tlachichilpa y Cerrillo.....	42
Cuadro 4. Fechas de siembra y tiempo de maduración por variedad en los ejidos de San Pedro el Alto y San Pablo Tlachichilpa.....	42
Cuadro 5.- F-Statistics Y Flujo Génico.....	45

INDICE DE FIGURAS.

Fig. 1 Componentes estructurales de la planta de maíz y grano.....	9
Fig. 2 Distribución de la raza cónica a nivel nacional.....	14
Fig. 3 Incidencia de luz en una celda espectrofotométrica.	16
Fig. 4 Esquema de electroforesis en agarosa.....	18
Fig. 5 Municipio de San Felipe del Progreso.....	30
Fig. 6 Germinación de las diferentes variedades de semillas.....	31
Fig. 7 Obtención de ADN.....	32
Fig. 8 Localización de los microsatélites en los cromosomas del maíz.....	35
Fig. 9 PCR.....	36
Fig. 10 Dendrograma: Distancias euclidianas Tlachichilpa.....	38

Fig. 11 Dendrograma: Distancias euclidianas Cerrillo.....	39
Fig. 12 Dendrograma: Relaciones genéticas Tlachichilpa.....	41
Fig. 13 Dendrograma: Relaciones genéticas Cerrillo.....	44
Fig. 14-18 Amplificaciones SSR.....	62

INDICE DE ANEXOS.

ANEXO 1 Formato entrevistas.....	53
ANEXO 2 Preparación de soluciones Stock.....	55
ANEXO 3 Calidad de Extracción ADN.....	57
ANEXO 4 Muestras colectadas.....	59
ANEXO 5 Amplificación con SSR.....	62

Resumen

El maíz es uno de los cereales más importantes a nivel mundial, tiene importancia alimentaria, cultural y económica. México es considerado el centro de diversificación del maíz debido a la gran variedad de razas y colores existentes. La caracterización es un parámetro importante en la evaluación de la diversidad, en la generación de conocimiento de la evolución génica, y en el planteamiento de estrategias de conservación. La revaloración de los recursos genéticos ha ido renovándose por avances en técnicas biotecnológicas que permiten la caracterización mediante huella genética. En este estudio se evaluaron morfológicamente, mediante la distancia euclidiana, 4 variedades cónicas de 2 productores de la comunidad de Tlachichilpa (San Felipe), así como 3 variedades de una parcela experimental de El Cerrillo. Se usaron 6 marcadores moleculares SSR (microsatélites) con el objetivo de caracterizar la diversidad genética. Las relaciones genéticas se calcularon por el método de distancia genética de Rogers y se generó un dendrograma mediante el método de UPGMA. Morfológicamente se observó mayor distribución de las variedades en el dendrograma. También, los datos muestran que no hay distancia genética entre el maíz negro y el maíz blanco de cada productor. Por otro lado, fue evidente un flujo genético mayor para la variedad blanca con $Nm=0.362$ individuos que migran por generación y menor para la variedad roja con $Nm=0.058$ individuos que migran por generación.

1. Introducción

Algunas fuentes de información reconocen a México a nivel mundial como centro de diversidad del maíz, esto es el resultado de prácticas de campesinos y grupos étnicos, quienes durante miles de años lograron la domesticación del maíz y que año con año realizan un intercambio continuo de sus semillas, con la finalidad de obtener un grano con mejores propiedades (Sain, 1997). El proceso de diversificación del maíz en México que ha dado lugar a la existencia de aproximadamente 64 razas¹ de maíz en el territorio mexicano (CONABIO, 2012). Es tan amplia la variedad² de razas existentes en México, que básicamente los campesinos las distinguen y nombran por el color del grano, son tan diversas que no hay un consenso exacto en cuanto a su diversidad. La planta de maíz tiene múltiples usos y es patrimonio cultural de México, es usada para un sin fin de aplicaciones, como materia prima para la industria, así como en la alimentación, en la producción de granos y forraje etc. En la actualidad los productores del estado de México pasan por condiciones adversas, económicas, climáticas, de rendimiento en su labor de producción, y a pesar de ello algunos generan aún maíz criollo local que han ido desarrollando durante varias generaciones, los cuales se sugiere siguen siendo los más apropiados, por su adaptación, características de producción y consumo (Bergvinson, *et al.*, 2007). La diversidad genética ha tenido lugar en el campo mexicano por el intercambio de semillas lo que ha permitido obtener una gran variedad de maíz: blanco, amarillo, rojo, negro, jaspeadas etc. El sistema local o informal de intercambio de semillas en las parcelas de los agricultores es un sistema que ha sido usado por los campesinos desde tiempo atrás, con el objetivo de mejorar la calidad y rendimiento de los cultivos. La funcionalidad de los sistemas de intercambio depende de las relaciones de parentesco entre agricultores, de sus antecedentes culturales y estabilidad económica. Sin embargo, muchos productores han empezado a optar por el uso de semillas híbridas, debido principalmente al rendimiento que obtienen en su producción, grandes terrenos en el municipio de San Felipe, principalmente en la zona centro, son usados para la siembra de variedades híbridas.

La inserción agronómica de plantas de maíz transgénicas, así como de variedades híbridas modernas posiblemente están generando una anulación de intercambio de genes. El cruzamiento entre individuos genéticamente relacionados genera endogamia o cruzamiento consanguíneo por lo cual se alteran las relaciones entre frecuencias génicas y genotípicas (García, 2007). se espera que los efectos de la endogamia causen fragilidad en las poblaciones y su extinción en un período muy corto de tiempo (Sánchez, 2011).

¹Raza: se define de acuerdo a Anderson y Cutler en 1942, como los individuos relacionados con suficientes características en común como para permitir su reconocimiento como grupo, siendo una clasificación principalmente agronómica. 7

² Variedad criolla: es el tipo de maíz que reconoce el agricultor bajo un mismo nombre y como parte de una misma unidad (Louette 1995, Rice *et al.* 1998).

De acuerdo a la literatura, se sabe que con frecuencia las razas de maíz criollo poseen una mejor adaptación específica a ciertas condiciones locales que las variedades mejoradas. Estas diferencias se acentúan en ambientes desfavorables, por lo que es de esperarse que las razas de maíz criollo, así como sus parientes silvestres aporten diversidad genética relacionada con adaptación a condiciones de estrés ambiental, incluyendo condiciones de sequía, especialmente en centros de origen y diversidad de cultivos, como lo es México (Ruiz, *et al.*, 2013).

Mediante la huella genómica, se pueden identificar plantas individuales dentro de una población o una serie de líneas endogámicas, se puede distinguir entre plantas cuya composición genética difiera ligeramente. Algunas técnicas usadas para obtener la huella genética son: Polimorfismos en Longitud de Fragmentos Amplificados AFLP, microsatélites y Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico RAPDs. Se pretende determinar la huella genética de diversas muestras de maíz en la parte noroeste del estado de México en el municipio de San Felipe del Progreso, realizando un muestreo dentro de una misma población, analizando las relaciones filogenéticas que son clave para la demostración de la diversidad genética del maíz en esta zona. El intercambio génico permite la diversidad de variedades y por ende la evolución del maíz.

2. Antecedentes

2.1 Maíz (*Zea mays*)

El maíz es una planta monoica de flores unisexuales, con flores masculinas y femeninas bien diferenciadas. La inflorescencia masculina que es terminal se conoce como panícula (o espiga) consta de un eje central o raquis y ramas laterales, a lo largo del eje central se distribuyen los pares de espiguillas de forma polística, cada espiguilla está protegida por dos brácteas, que a su vez contienen en forma apareada las flores estaminadas; en cada florecilla componente de la panícula hay tres estambres donde se desarrollan los granos de polen. Por el contrario, las inflorescencias femeninas (mazorcas) (Fig1) se localizan en las yemas axilares de las hojas, son espigas de forma cilíndrica que consisten de un raquis central u olote donde se insertan las espiguillas por pares, cada espiguilla con dos flores pistiladas, una fértil y otra abortiva, estas flores se arreglan en hileras paralelas, las flores pistiladas tienen un ovario único con un pedicelo unido al raquis, un estilo muy largo con propiedades estigmáticas donde germina el polen. La inflorescencia femenina (mazorca) puede formar alrededor de 400 a 1000 granos arreglados en promedio de 8 a 24 hileras por mazorca; todo esto encerrado en numerosas brácteas u hojas, los estilos largos saliendo de la punta del raquis se conocen como pelo de elote, debido a las características morfológicas mencionadas se puede decir que el maíz es una planta de polinización abierta (anemófila) propensa al cruzamiento, la gran mayoría de los granos de polen viajan por medio del viento de 100 a 1000 m (Kato, *et al.*, 2009).

En la mazorca, cada grano es un fruto independiente llamado cariósipide ya que tiene la semilla envuelta en el pericarpio, estos están insertados en el olote, la cantidad de grano producido por mazorca está limitada por el número de granos por hilera y de hileras por mazorca. Como cualquier otro cereal, las estructuras que constituyen el grano del maíz (pericarpio, endospermo y embrión) le confieren propiedades físicas y químicas (color, textura, tamaño, etc.) que han sido importantes en la selección del grano como alimento (Kato, *et al.*, 2009).

En la germinación de los granos de maíz, la coleoriza comienza elongándose y sale a través del pericarpio, después aparece la radícula a través de la coleoriza. Inmediatamente después de la emergencia de la radícula también emergen tres o cuatro raíces adventicias. Al mismo tiempo o muy pronto después, emerge el coleóptilo en el otro extremo de la semilla, el coleóptilo es empujado hacia arriba por la elongación del mesocotilo, el cual empuja al naciente coleóptilo hacia la superficie de la tierra. El mesocotilo tiene un papel importante en la emergencia de la plántula del maíz hacia la superficie y tiene una gran plasticidad sobre la tasa de crecimiento y la longitud a que llega. Cuando el extremo del coleóptilo surge a través

de la superficie cesa la elongación del mesocotilo, emergen las primeras hojas a través del coleóptilo y estas aparecen sobre la tierra (Ripusudan, 2001).

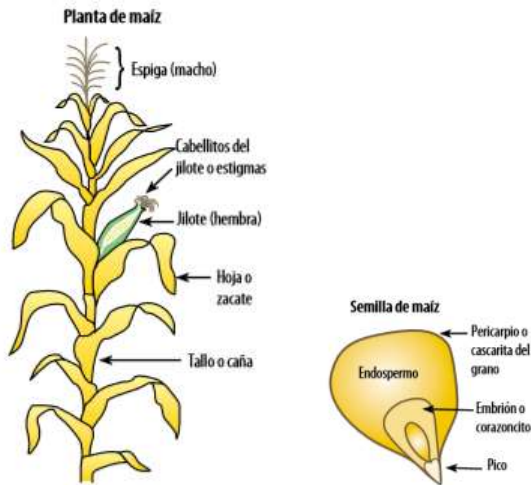


Fig. 1.- Componentes estructurales de la planta de maíz y grano. Tomado de Bergvinson, et al., 2007.

2.2 Gametogénesis y fertilización del maíz

La gametogénesis ocurre antes que la fertilización, se lleva a cabo en dos partes diferentes, la gametogénesis masculina o microsporogénesis se desarrolla en los estambres dando lugar a 4 microsporas, cada una de las cuales encierra las 2 células espermáticas en el grano de polen. La gametogénesis femenina o macrosporogénesis da lugar a 4 megasporas, 3 de esas megasporas no son funcionales y solo una de ellas da lugar al saco embrionario, donde se encuentra el óvulo, 3 células antípodas, 2 sinérgidas, y 2 núcleos polares que se fusionan en el momento de la fertilización. Si un óvulo no es fertilizado exitosamente en una ventana de siete días, el estigma muere, el óvulo no fertilizado eventualmente desaparece, y la parte del elote al que está adherido este óvulo se vuelve estéril (Endicott, 2015). Los granos de polen salen de las anteras (anthesis) y son transportados por el viento a los pistilos de las plantas vecinas, el viento transporta el polen a grandes distancias, por lo que para mantener un campo aislado de otro debe haber una distancia de 1000 m, tomándose en cuenta que la floración masculina ocurre días antes que la femenina. El polen es funcional dentro de las 24 horas que siguen a la salida de las anteras, cuando cae sobre los estilos o los pelos estigmáticos, el tubo polínico penetra por el cuerpo del estilo o por uno de los pelos estigmáticos y una vez dentro del estilo pasa por el tejido vascular hasta el ovario.

La doble fertilización ocurre cuando uno de los núcleos espermáticos del grano de polen se une con el ovulo para formar el embrión y cuando el otro núcleo espermático se une con los núcleos polares previamente fusionados para formar el endospermo (IICA, 1991).

2.3 Formación del grano

La unión de los gametos da lugar al cigoto con el que se inicia la fase esporofítica de la planta del maíz. El cigoto se divide por primera vez 12 horas después de la fertilización, días después de la fertilización se aprecian las partes del embrión: radícula, coleóptilo y escutelo. El endospermo está formado por la unión del otro núcleo espermático del grano de polen con los núcleos fusionados, el endospermo es parte del esporofito y aunque está en la misma semilla donde está el embrión puede mostrar las consecuencias de la alternancia génica, mientras que el embrión da lugar a la planta en la cual se observan las variaciones hereditarias (IICA, 1991).

2.4 Alternancia de generaciones

La planta de maíz de $2n = 20$ cromosomas en todas sus células, 10 provienen del padre y los otros 10 de la madre, los gametos tienen 10 cromosomas. La unión de un núcleo espermático del grano de polen con la oosfera, da lugar al embrión con 20 cromosomas. La unión del otro núcleo espermático del polen con el núcleo producto de la fusión de los dos núcleos polares que tienen 20 cromosomas, da lugar al endospermo del grano de maíz que tiene 30 cromosomas ($3n$). Por otro lado, los caracteres del pericarpio no segregan, si el color del grano se debe al pericarpio, todos los granos son del mismo color, ya que es herencia materna y antes de que ocurra la fertilización, el color del pericarpio ya está definido por el genotipo de la planta madre (IICA, 1991).

2.5 Origen del maíz

Existen discrepancias respecto al origen del maíz, se considera que el maíz fue una de las primeras plantas cultivadas por agricultores. La evidencia más antigua del maíz como alimento humano proviene de lugares arqueológicos de México, donde algunas pequeñas mazorcas de maíz estimadas en más de 5000 años de antigüedad fueron encontradas en cuevas de los habitantes primitivos (Ripusudan, 2001).

2.6 Origen mexicano

El maíz se originó en México donde el maíz y el teocintle han coexistido desde la antigüedad y donde ambas especies presentan una diversidad muy amplia. El hallazgo de polen fósil y de mazorcas de maíz en cuevas de zonas arqueológicas apoyan la posición de que el maíz se habría originado en México (Ripusudan, 2001).

Algunos elementos documentales indican que México fue el centro primario de origen, domesticación y dispersión del maíz y que las migraciones humanas lo llevaron a Sudamérica (considerado como centro secundario) desde hace más de 5 mil años. Se cree que de nuestro país se dispersó hacia el norte del continente y posteriormente a Europa y Asia. Actualmente aún no se ha definido el origen del maíz domesticado en México, sin embargo, la teoría más aceptada establece que el ancestro del maíz es el teocintle, el cual aún encontramos creciendo en forma silvestre en muchas regiones de nuestro país. Algunas de las evidencias del origen mexicano del maíz se encuentran en la escultura y cerámica prehistórica mexicana, en antiguos códices, en reliquias de maíz prehistórico, como el penacho de la diosa zapoteca del maíz "centiocihuatl", el cual está ornamentado con moldes de mazorcas de maíz, éste ídolo data entre los años 600 a 800 antes de Cristo. Por otra parte, muestras arqueológicas obtenidas en 1949, revelaron la existencia de olotes de maíz, con una antigüedad de 4,445 años aproximadamente y que fueron encontrados en la Cueva de la Perra en Tamaulipas, México (INEGI, 1997).

2.7 Contexto económico del maíz

En México, la conservación de las razas nativas del maíz al interior de las parcelas de cultivo, tiene un valor económico especial, los espacios dedicados al cultivo del maíz son los espacios de la economía campesina. En 2017 se estimó una producción de 23.3 millones de toneladas de maíz blanco (SAGARPA, 2017). Prácticamente tres millones de personas trabajan en el cultivo del maíz, equivalente a más del 40% de la fuerza de trabajo del sector agrícola o cerca de un ocho por ciento del total de la fuerza laboral de México (Kato, *et al.*, 2009).

2.8 Clasificación del maíz

2.8.1 Clasificación de las razas de maíz en México

Las razas de maíz en México se clasifican en 7 grupos con base en caracteres morfológicos, de adaptación y genéticos (isoenzimas). Los cuales son los siguientes: Grupo Cónico, Grupo Sierra de Chihuahua, Grupo 8 hileras, Grupo Chapalote, Grupo tropicales precoces, Grupo dentados tropicales y Grupo

maduración tardía. De las 64 razas que se reportan para México, 59 se pueden considerar nativas y 5 que fueron descritas inicialmente en otras regiones (Cubano Amarillo, del Caribe, y cuatro razas de Guatemala, una de ellas Nan Tel de Altura), pero que también se han colectado o reportado en el país (CONABIO, 2012).

Las razas se nombran a partir de diferentes características fenotípicas, como (cónico por la forma de la mazorca), por el lugar o región donde inicialmente fueron colectadas o son relevantes (Tuxpeño de Tuxpan, Veracruz; Chalqueño, típico de Valle de Chalco) o por el nombre con que son conocidas por los grupos indígenas o mestizos que las cultivan (CONABIO, 2012). Sin embargo, cada raza puede comprender numerosas variantes, formas de mazorca, color y textura de grano, adaptaciones y diversidad genética.

2.9 Siembra de maíz en el estado de México

Existen diversas variedades de maíz las cuales se pueden encontrar en el Estado de México, como el maíz criollo, mejorado e híbrido, cada productor elige la variedad que se cultiva en cada zona, se toman en cuenta datos como: altura sobre el nivel del mar, condiciones de clima, intensidad, frecuencia de las heladas, precipitación pluvial y disponibilidad de sistemas de riego, así como características nutricionales que desea obtener en los granos, la época y la cantidad de siembra, son también datos importantes para establecer la variedad que se va a cultivar (INEGI, 1997).

En el Estado de México, se distribuyen principalmente las siguientes razas: Tuxpeño, Celaya, Cónico, Cónico Norteño, Chalqueño, Elotes Cónicos, Bolita, Pepitilla, Cacahuacintle, Palomero, Arrocillo Amarillo, Ancho y Azul (González, 2012).

2.9.1 Grupo cónico

El grupo cónico incluye razas de maíz cuya característica resaltante es la forma cónica o piramidal de sus mazorcas. Dentro de este grupo se incluyen: Arrocillo, Cacahuacintle, Cónico, Cónico norteño, Chalqueño, Dulce, Elotes Cónicos, Mixteco, Mushito, Mushito de Michoacán, Negrito, Palomero de Jalisco, Palomero toluqueño y Uruapeño. El grupo cónico es uno de los más característicos y endémicos de México. Las razas del grupo cónico se distribuyen predominantemente en las regiones con elevaciones de más de 2,000msnm y en su mayoría son endémicas de los valles altos y sierras del centro del país, Valle de México, Valle de Toluca, Sierra Norte de Puebla, Michoacán y Oaxaca (Fig 2), por lo que este grupo se encuentran ampliamente distribuidas en el Municipio de San Felipe del Progreso (CONABIO, 2012).

Las razas de este grupo tienen en común: mazorcas de forma cónica, números altos de hileras de grano, entre 14 y 20, granos de 4 a 8 mm de ancho con textura variable, desde harinosos hasta palomeros, número reducido de ramas de la espiga y sistema de raíces débiles (CONABIO, 2012).

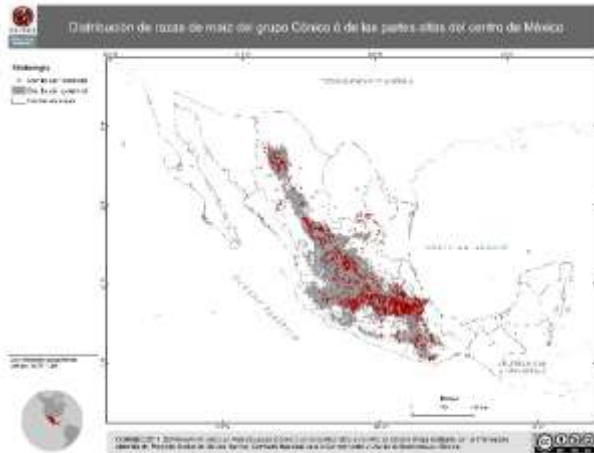


Fig. 2.- Distribución de la raza cónica a nivel nacional. Tomado de CONABIO, (2012).

2.10 Caracterización genética

Mediante la caracterización genética de maíz se puede determinar las relaciones filogenéticas e identificar si existe intercambio génico y por ende diversidad de maíz. La huella genómica permite que se puedan identificar plantas individuales dentro de una población y distinguir entre plantas cuya composición genética difiera ligeramente. Algunos marcadores moleculares para identificar la huella genética son AFLP, microsatélites y RAPDs (Gutiérrez, *et. al.*, 2009).

2.10.1 Extracción y purificación de ADN genómico

La extracción y purificación de ácidos nucleicos constituye la primera etapa de la huella genética, los métodos de extracción permiten obtener ácidos nucleicos purificados a partir de germoplasma. La extracción consiste en el aislamiento y purificación de ADN, la técnica se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. Los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere al ADN una carga neta negativa y lo hace altamente polar, características que son aprovechadas para su extracción. Los grupos fosfato tienen una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa, lo que permite disolver al ADN en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula, en presencia de etanol, se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos

fosfato. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como Na^+ que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN precipite. Los protocolos tradicionales de aislamiento de ADN consisten de cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN (Cornejo, *et al.*, 2014).

Seleccionar un método de extracción es un paso fundamental en las técnicas moleculares, de ello dependen diferentes factores como el organismo de estudio, el tejido disponible, su estado de conservación, la técnica que se aplicara posteriormente, así como la infraestructura de los laboratorios, los recursos económicos y tiempo para obtener resultados. Independientemente del método seleccionado es recomendable encontrar un equilibrio entre pureza y rendimiento de acuerdo a la aplicación para la que se requiera el ADN (Cornejo, *et al.*, 2014).

2.10.2 Cuantificación de ADN mediante espectrofotometría

La espectrofotometría es un método de análisis cuantitativo, se basa en la capacidad de las sustancias de absorber luz a una longitud de onda (λ) determinada, en proporción directa a la cantidad de materia presente, mediante el espectrofotómetro se obtiene una medida del valor de la absorbancia de una muestra a determinada longitud de onda. Un haz de luz (L_i) incide a una determinada longitud de onda (λ) sobre una muestra, una parte de esta luz es absorbida y la otra parte es transmitida (L_t) (Fig. 3) (Quesada, 2007) .

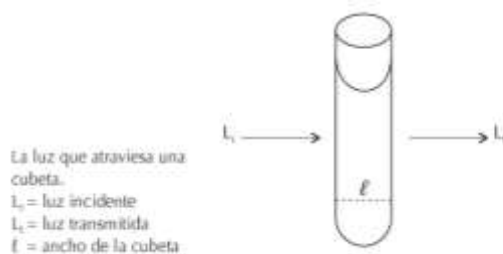


Fig. 3.-Incidencia de luz en una celda espectrofotométrica.
Tomada de Quesada, 2007.

La cantidad de luz absorbida por la muestra es directamente proporcional a la concentración de la muestra (a mayor concentración, mayor absorción y menor transmisión) y a la longitud del cuerpo atravesado por el haz (ancho de la celda).

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

A = Absorbancia

ϵ = Coeficiente de extinción molar

c = Concentración de la muestra

l = Diámetro de la cubeta

El coeficiente de extinción molar, ϵ , es una constante para cada sustancia, y el diámetro de la cubeta, l , es fijo, la absorbancia depende directamente de la concentración de la sustancia, lo que se conoce como ley de Beer y Lambert (Quesada, 2007).

La concentración de ADN se puede estimar utilizando un espectrofotómetro de luz ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 260 nm, debido a que las bases púricas y pirimidínicas del ADN absorben la luz UV a esta longitud de onda, la determinación de la pureza del ADN se establece mediante la relación de las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm. Es así como una unidad (u) de densidad óptica (DO) a 260 nm equivale a 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN doble cadena (Concepción, 2005).

La concentración de cada muestra se calcula con la relación (CIMMYT, 2006):

$$[\text{ADN}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = (\text{DO } 260 \text{ nm}) (\text{FD}) (50 \mu\text{g}/\mu\text{l})$$

Donde:

$$[\text{ADN}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = \text{Concentración de ADN}$$

$$(\text{DO } 260 \text{ nm}) = \text{Lectura a } 260 \text{ nm}$$

$$\text{FD} = \text{Factor de dilución} = (50)$$

2.10.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction), es una técnica revolucionaria en biología molecular, que permite obtener *in vitro* millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN). La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde. La PCR se encarga de simular en tubo la replicación que ocurre de manera intracelular. La síntesis de las nuevas cadenas de ADN se lleva a cabo mezclando el ADN que contiene el o los fragmentos que se van a amplificar, la polimerasa, los iniciadores (fragmento de ADN de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar y que aportan el extremo 3' libre para que inicie la transcripción), desoxinucleótidos (dNTPs), cloruro de magnesio (MgCl_2) u otro co-factor necesario

para que trabaje la polimerasa y una solución amortiguadora que mantenga el pH apropiado para que se lleve a cabo la síntesis. El ciclo de la PCR inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96 °C rompiendo así los puentes de hidrogeno que las unían, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN. Una vez separadas las cadenas del ADN, se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura entre 40 y 60 °C (Cornejo, *et al.*, 2014).

Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura (por lo general a 72 °C), esta temperatura es óptima a la cual la ADN polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación. Estas tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión del ADN, se repiten sucesivamente, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias, de esta manera cada nueva copia servirá de molde en los ciclos subsecuentes, dando origen a millones de copias del fragmento seleccionado (Cornejo, *et al.*, 2014).

2.10.4 Electroforesis

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas por aplicación de un campo eléctrico (Fig. 4), las moléculas migran en el campo eléctrico a una velocidad determinada por su relación carga-masa. Mediante la electroforesis pueden separarse diferentes tipos de fragmentos en función de su tamaño, como ADN y ARN, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. Si el estudio lo requiere se puede además extraer del gel los fragmentos de ADN que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones. La electroforesis de ADN es una herramienta de importancia primordial en el desarrollo de las técnicas del ADN recombinante o ingeniería genética (Lodish, 2005).

La electroforesis de ADN puede realizarse en geles de agarosa o de poliacrilamida, ambos tienen características diferentes en cuanto a sus propiedades y modo de preparación, por lo que se utilizara uno u otro en función de la aplicación y objetivos que se persigan. La electroforesis en geles de agarosa es el método estándar para separar y purificar fragmentos de ADN cuando no requerimos un alto poder de resolución. Por su parte, la electroforesis en geles de poliacrilamida, aunque tiene una mayor limitación en cuanto al tamaño de los fragmentos que podemos separar

(5-600 pb), posee un poder de resolución mucho mayor, permitiendo la separación de moléculas que difieren en un solo par de bases. Los geles de poliacrilamida se corren de forma vertical y tienen la desventaja de ser más complicados en su elaboración y manipulación. La agarosa es un polímero lineal extraído de algas marinas, los geles de agarosa tienen un poder de resolución mucho menor que los de poliacrilamida, no permiten separar moléculas de ADN que difieren en tamaño en menos de unas 50 pb. Sin embargo, el rango de tamaños que pueden separarse es mucho mayor en un gel de agarosa (moléculas desde 50 pb hasta unos 40 kb) dependiendo de la concentración del mismo (0.3-2% p/v); cuanto más baja es la concentración de agarosa mayor es el tamaño de las moléculas que pueden separarse, y viceversa. Los geles de agarosa convencionales se corren en una cámara de electroforesis horizontal, con un campo eléctrico uniforme y constante (Cornejo, *et al.*, 2014). El ADN está cargado negativamente debido a los grupos fosfato de la molécula, por lo que este migra del polo negativo al polo positivo en la cámara de electroforesis. Existe una relación lineal entre la movilidad electroforética del ADN y la concentración del gel: a mayor concentración menor rango de separación.

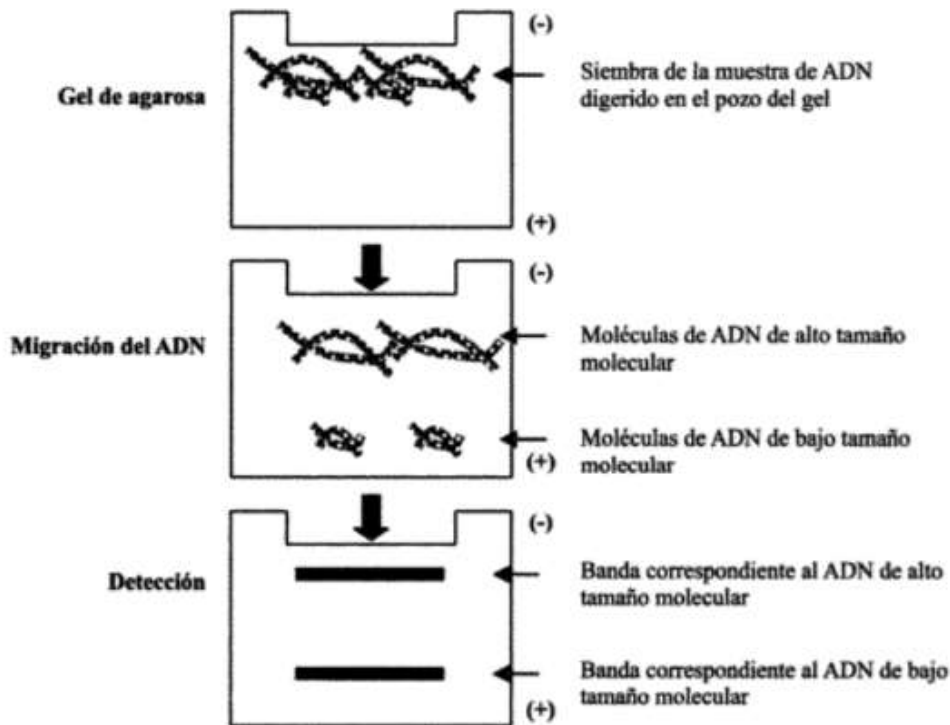


Fig. 4.- Esquema de electroforesis en agarosa, los fragmentos de ADN corren del cátodo al ánodo.

Tomada de Lodish, 2005.

2.11 Variabilidad Genética.

La variabilidad genética o diversidad genética se considera el componente más básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie. El resto de la biodiversidad se deriva de los procesos evolutivos que operan sobre esas variaciones. La variabilidad genética tiene importancia en conservación, avance de la genética evolutiva, salud pública, la sustentabilidad y la productividad agrícolas, pecuarias, pesqueras y forestales, la domesticación y la biomedicina. La variabilidad genética permite el estudio de diversas vertientes: (a) evaluar la capacidad de respuesta de las poblaciones y especies ante los cambios ambientales naturales o provocados por las actividades humanas conscientes o inconscientes; (b) evaluar los riesgos de la pérdida de especies, poblaciones y recursos genéticos que disminuyen nuestra capacidad de sobrevivencia como sociedad y como especie; (c) conocer la riqueza genética de la nación y su distribución geográfica; (d) planear las estrategias de aprovechamiento y conservación de poblaciones, especies y recursos genéticos; (e) entender la forma, la velocidad y las causas de la pérdida de la diversidad genética; (f) evaluar los riesgos de introducción de enfermedades, plagas, especies invasoras, variedades mejoradas y modificadas genéticamente sobre las poblaciones, especies nativas y recursos genéticos de plantas animales y humanos (Piñero, 2008).

2.12 Flujo génico

El flujo génico o migración se refiere a todos los mecanismos que resultan en el movimiento de genes de una población a otra, el flujo génico es un importante componente de la estructura poblacional, ya que sus patrones y niveles determinan hasta qué grado cada población de una especie es una unidad evolutiva independiente. La tasa de movimiento de genes de una población a otra afecta de manera importante a las especies. La cantidad de flujo génico necesaria para prevenir la evolución independiente de las poblaciones de una especie dependerá de las otras fuerzas evolutivas. La estimación del flujo génico Nm se da de la siguiente manera si es menor que 1 se puede decir que la deriva actúa independiente en cada una de las poblaciones, si es mayor que 1 las poblaciones son homogéneas (Piñero, 2008).

$$Nm = \frac{0.25(1-Fst)}{Fst}$$

Donde:

Nm= flujo génico.

0.25= constante.

Fst= coeficiente global de diferenciación genética entre poblaciones.

La correlación entre los genes de los individuos (I) y los de la población total (T) es representada por F_{IT} , que corresponde a la endogamia total. La correlación entre los genes de los individuos y los de la subpoblación (S) es representada por F_{IS} , mientras que la correlación entre los genes de la subpoblación y los de la población total está representada por F_{ST} , que es igual a la probabilidad de que dos alelos idénticos por descendencia se combinen en un cigoto, o autocigosis. Los estadísticos F se relacionan entre sí de la siguiente manera: $(1 - F_{IT}) = (1 - F_{ST})(1 - F_{IS})$ y por lo tanto:

$$F_{ST} = \frac{F_{IT} - F_{IS}}{1 - F_{IS}} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

F_{ST} : Su interpretación es sencilla: si es de 0, indica que las frecuencias alélicas son iguales en todas las poblaciones, no ha habido diferenciación ($H_T = H_S$). El máximo posible es de 1, cuando cada población está fija en alelos diferentes ($H_S = 0$) (Piñero, 2008).

2.13 Marcadores moleculares

2.13.1 Microsatélites

Microsatélites (SSRs, por sus siglas en inglés, *simple sequence repeats*), son secuencias de ADN hipervariables, constituidas por repeticiones de nucleótidos de 1 a 6 pares de bases, estas se distribuyen en regiones codificantes y no codificantes y se caracterizan por ser altamente polimórficos en lo que se refiere a su longitud, por lo tanto, son regiones adecuadas para usarse como marcadores moleculares a nivel poblacional. Este alto grado de polimorfismo es consecuencia de una elevada tasa de mutación (desde 10^{-6} hasta 10^{-2} mutaciones por sitio y por generación), este alto grado de polimorfismo en el tamaño, y el hecho de que estos marcadores son codominantes, hace que puedan ser analizados, lo cual reduce el tiempo y el costo de la técnica en los casos en los que es necesario estudiar numerosas muestras y múltiples loci. Los microsatélites pueden estar compuestos por repeticiones del mismo nucleótido (mononucleótidos), por dos (dinucleótidos), por tres (trinucleótidos) y así hasta seis nucleótidos (hexanucleótidos). Los microsatélites que están compuestos por un motivo único se consideran puros o

perfectos (por ejemplo, AAAAAAAAAA o (A) 11); aquellos conformados por dos o más motivos se denominan compuestos (como, AAAAAATTTTTT o (A)7(T)7) y se conocen como interrumpidos cuando un nucleótido o más se insertan en alguna parte de la repetición (por ejemplo, AAAAAAGAAAAA o (A)6G(A)6). Cuando se encuentran fuera de regiones codificantes, los microsatélites suelen considerarse como regiones génicas sin función alguna. Sin embargo, se ha propuesto que en ciertos genes las regiones repetidas del extremo 5' no transcrito tienen una función reguladora y actúan como regiones de unión para factores de transcripción. El elevado polimorfismo de los microsatélites se atribuye a dos mecanismos de mutación: el deslizamiento en el apareamiento de las hebras de ADN (*slippage misspairing*) y el entrecruzamiento desigual (*unequal crossing over*) (Cornejo, *et al.*, 2014).

Los microsatélites permiten descubrir genealogías génicas y conocer el grado de parentesco entre individuos a fin de programar cruzamientos que prevengan niveles de consanguinidad altos que puedan llevar a la depresión biológica y su posible extinción, etc. Para la conservación de las especies se debe conocer la estructura metapoblacional de las especies, lo cual supone la determinación de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones. Las ventajas de los microsatélites frente a otros marcadores moleculares, son que los tejidos no deben ser de mucha calidad, por lo que es más preciso que otras técnicas como RAPDs ó RFLPs (González, 2003).

2.13.2 RAPD

Los RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) son marcadores moleculares que detectan polimorfismos en secuencias de ADN, se basan en amplificación por PCR. Los marcadores RAPD se basan en un único cebador, corto y de secuencia arbitraria, se emplean ciclos de hibridación del cebador a baja temperatura para amplificar un conjunto de fragmentos genómicos, los cuales se separan por tamaño mediante electroforesis, los fragmentos son amplificados aleatoriamente por el genoma del individuo analizado, todos ellos tienen en común que se encuentran flanqueados por la secuencia del cebador. La separación por electroforesis genera un patrón multibanda característico de cada individuo analizado, así, si entre dos individuos existe polimorfismo o variación en la secuencia se producirá un patrón multibanda diferencial entre los individuos, las inserciones y deleciones entre sitios de unión del cebador generan la amplificación de fragmentos de tamaño diferencial (Koh, 1998).

2.13.3 AFLP

El método de AFLP (*Polimorfismos en Longitud de Fragmentos Amplificados*), se basa en amplificación selectiva de fragmentos de ADN genómico digerido con enzimas, el ADN es incubado con dos endonucleasas que producen fragmentos de diferentes tamaños, comúnmente se usan las enzimas de restricción *EcoRI*, *Asel*, *HindIII*, *Apal* y *PstI* generando fragmentos muy grandes debido a la baja frecuencia de estos sitios de corte. Para aumentar el número de cortes, por otro lado, la digestión se lleva a cabo en combinación con otra enzima (*MseI* ó *TaqI*) que solamente necesita 4 bases y que, por lo tanto, genera mayor número de fragmentos. A los fragmentos generados se les acopla unos "adaptadores" (oligonucleótidos sintéticos) de doble cadena, de 10-30 pb, en los extremos, utilizando la enzima T4 ADN ligasa, estos adaptadores se usan como primers que contiene además una extensión de 1 a 3 nucleótidos en el extremo 3', y algunas veces un marcador radioactivo o fluorescente para su detección, con estos primers solo se amplificaran los fragmentos que tengan nucleótidos extras. Los productos amplificados son separados en un gel de poliacrilamida y el polimorfismo se identifica por la presencia o ausencia de una banda determinada (Montaño, 2006).

2.13.4 Distancia genética

La genética de poblaciones estudia los patrones y causas de la diversidad genética. La distancia que separa a dos o más loci ligados puede estimarse por la frecuencia de recombinación entre ellos, esta distancia se puede expresar de dos formas: distancia genética o distancia física. La distancia genética es la frecuencia de recombinación entre dos loci. La distancia física es el número de pares de bases de nucleótidos que hay entre ellos. La distancia genética es relativa, depende de la distribución del entrecruzamiento con recombinación a lo largo de cada cromosoma. El entrecruzamiento no se distribuye de forma homogénea a lo largo de todos los cromosomas, existen bloques de segmentos de ADN no recombinantes. La estimación de la distancia genética entre dos o más loci génicos, está en relación a cuan frecuentemente se produce la recombinación genética entre ellos y cuan frecuentemente no ocurre (Passarge, 2007).

Las distancias genéticas se pueden dividir en dos grupos, el primero es de distancias geométricas, que simplemente reflejan la similitud entre poblaciones con respecto a las frecuencias alélicas que éstas presentan en determinados sistemas genéticos, sin asumir a priori supuesto evolutivo alguno. A este grupo corresponden la distancia de Rogers y la D_A Nei. Constituyen simplemente una visión geométrica de las distancias entre puntos en una hiperesfera cuyo número de dimensiones es

igual al de alelos considerados en la comparación. El segundo grupo de distancias comprende a aquellas que se basan en modelos evolutivos, donde la variación es atribuida principalmente a la acción de la mutación y la deriva, asumiendo que los marcadores utilizados no están sujetos a la selección natural (Demarchi, 2009).

2.13.4.1 Distancia de Rogers.

Se define como

$$d_{AB}^2 = \frac{1}{2} \sum (P_{Aj} - P_{Bj})^2$$

Es una distancia basada en el cuadrado de diferencias de las características estudiadas entre las poblaciones, que pueden ser observadas como la varianza de dichas características, en este caso frecuencias alélicas. Es una extrapolación de la distancia euclidiana a un espacio de dos o más dimensiones (Rogers, 1972).

2.13.4.2 Distancia Euclidiana.

La distancia euclidiana es una medida de cercanía o alejamiento, en esencia es la suma de las diferencias entre los valores de los atributos de cada entidad comparada. Es usada para la medición de distancias biológicas con el propósito de estudiar métodos numéricos que señalen diferenciación o similitud entre razas, etnias, especies, cuando se registran números o características multivariadas (Vinuesa, 2016). Definida en su expresión:

$$D_{AB} = \sum (X_{Aj} - X_{Bj})^2$$

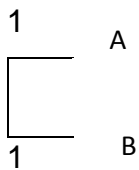
2.13.4.3 Análisis de conglomerados UPGMA

Las construcciones de árboles filogenéticos por métodos de distancia son computadas por todos los pares de taxones, el árbol filogenético es construido considerando las relaciones entre los valores de distancia. UPGMA (método de promedios aritméticos por pares no ponderados) es un método para la construcción de árboles filogenéticos, el árbol es construido mediante agrupamiento de secuencias conocidas como unidades taxonómicas operacionales (OTU) las cuales pueden ser especies, géneros o cualquier categoría taxonómica. Cuando los OTU son muy similares unos a otros es debido a que la distancia entre ellos es muy pequeña (Lemey, 2009).

El análisis en tándem con el método UPGMA procede de la siguiente manera, en un grupo de conglomerados se observan las distancias de cada OTU en una matriz inicial (Lemey, 2009).

	A	B	C	D	E
B	2				
C	4	4			
D	6	6	6		
E	6	6	6	4	
F	8	8	8	8	8

Se eligen los taxones que tienen la distancia menor, en este caso AB. La distancia correspondiente entre estos es igual a $d(AB)/2=2/2=1$.



Se calcula una nueva matriz reducida que agrupa el taxón (AB) con las otras OTU.

$$d(AB)C=(dAC+dBC)/2=4$$

$$d(AB)D=(dAD+dBD)/2=6$$

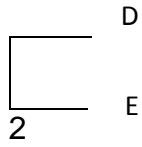
$$d(AB)E=(dAE+dBE)/2=6$$

$$d(AB)F=(dAF+dBf)/2=8$$

	(AB)	C	D	E
C	4			
D	6	6		
E	6	6	4	
F	8	8	8	8

Se repiten los pasos anteriores y se eligen los dos taxones con la menor distancia (DE).

2

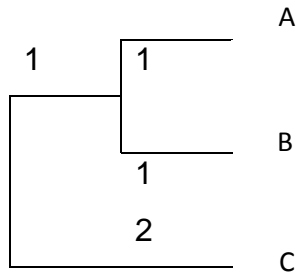


$$d(DE)AB = (dD(AB) + dE(AB)) / 2 = 6$$

$$d(DE)C = (dDC + dEC) / 2 = 6$$

$$d(DE)F = (dDF + dEF) / 2 = 8$$

	(AB)	C	(DE)
C	4		
(DE)	6	6	
F	8	8	8

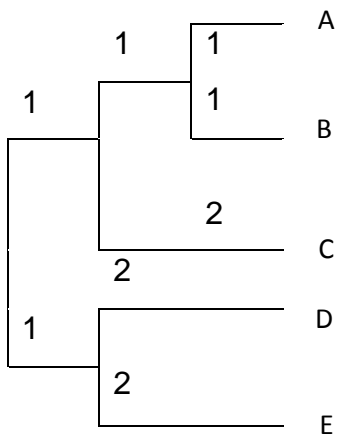


Nuevamente se debe calcular una matriz reducida que agrupa a los OTU (ABC).

	(ABC)	(DE)
(DE)	6	
F	8	8

$$d(ABC)(DE) = (d(AB)(DE) + dC(DE)) / 2 = 6$$

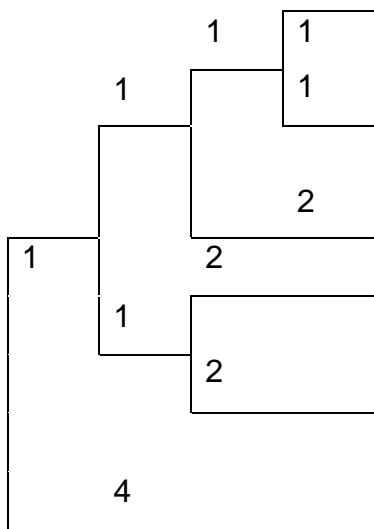
$$d(ABC)F = (d(AB)F + dCF) / 2 = 8$$



Por último, la distancia del conglomerado (ABCDE) para el OTU F. Permite formar el árbol filogenético final (Lemey, 2009).

	(ABC)(DE)
F	8

$$d(\text{ABCDE})F = (d(\text{ABC})F + d(\text{DE})F) / 2 = 8$$



2.14 Estudios en *Zea mays*

En el municipio de San Felipe del progreso se han realizado estudios de manejo y uso de la diversidad del maíz (Castillo, 2016). En este estudio se describe el uso alimenticio y gastronómico de las variedades, así como la importancia de la variabilidad. También se han hecho estudios comparativos del ciclo agrícola actual con 10 años atrás (Cruz, 2011), los cuales mencionan el ingreso de variedades híbridas y la problemática de la migración poblacional. Sin embargo, de nuestro conocimiento, no existen estudios de huella genómica para este municipio. Pero se han reportado trabajos, en el país, sobre la variación genética en maíces criollos Loxicha, Oaxaca (Aragón, 2007). En éste último estudio, se hace una comparación de la huella genómica mediante microsatélites de variedades de dos comunidades, encontrando diversidad genética.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Identificar la diversidad morfológica y genética de variedades de maíz, resultado de las prácticas de intercambio de semillas que se realizan en la comunidad de Tlachichilpa, Estado de México.

3.2 Objetivos particulares

3.2.1 Caracterizar morfológicamente variedades autóctonas de la zona de Tlachichilpa y cultivo experimental en El Cerrillo.

3.2.2 Determinar relaciones filogenéticas de maíces nativos mediante marcadores moleculares (microsatélites afines a variedades cónicas), dentro de una población de Tlachichilpa, así como de un cultivo experimental en El Cerrillo.

4. Hipótesis

Las prácticas actuales de producción de maíz en la comunidad de Tlachichilpa Estado de México permiten la existencia de diversidad genética de razas y variedades de maíz.

5. Materiales y Métodos

5.1 Muestreo de variedades de mazorcas

La colecta de maíz se llevó a cabo dentro de la comunidad de San Pablo Tlachichilpa ubicada en el municipio de San Felipe del Progreso localizado al noroeste del Estado de México (Fig. 5). Se elaboraron entrevistas para recabar la información de características morfológicas (ANEXO 1), los productores proporcionaron las diversas muestras del grupo cónico con variantes de color amarillo, blanco, rojo y negro.



Fig. 5.-Municipio de San Felipe del Progreso, Tlachichilpa se encuentra cercano a la cabecera municipal Tomado de www.sanfelipedelprogreso.gob.mx

Por otro lado, para la verificación de diversidad por parte de los marcadores moleculares se colectaron mazorcas amarillas, rojas y negras del grupo cónico, provenientes de las comunidades de Temoaya y Jiquipilco, las cuales fueron sembradas en una parcela experimental en El Cerrillo Piedras Blancas, Estado de México. La parcela demostrativa se estableció en el ciclo agrícola 2017. La siembra de las variedades fue en líneas de 80 cm entre surco y 10 cm de separaciones entre planta y planta, con una densidad total de 125,000 plantas por hectárea.

5.2 Caracterización morfológica

Las variedades de maíz se caracterizaron morfológicamente aplicando la guía de descriptores para maíz, del Proyecto global de maíces nativos (Rincón, 2010); así como la base de datos de CONABIO Comisión Nacional para el Conocimiento y uso

de la Biodiversidad (2012). Se realizó una clasificación de características cualitativas y cuantitativas de la mazorca y grano, para la descripción varietal, se registraron variables como: peso de mazorca, número de hileras, número de granos promedio por hilera, diámetro de mazorca, color de grano, tipo de grano, disposición de hileras y forma de mazorca. Se efectuó un análisis de conglomerados usando los valores de las variables, estimándose una matriz de distancias euclidianas promedio, y realizando un dendrograma por el método UPGMA.

5.3 Germinación de semillas

Las semillas fueron germinadas siguiendo un procedimiento aséptico, desinfectando la semilla superficialmente con una solución de etanol al 75% (v/v) (Fig. 6) posteriormente se germinaron en caja Petri con una cama de algodón y agua estéril, se incubaron a 28°C durante 5 días, hasta que las muestras generaron un coleóptilo de aproximadamente 8 cm de largo.

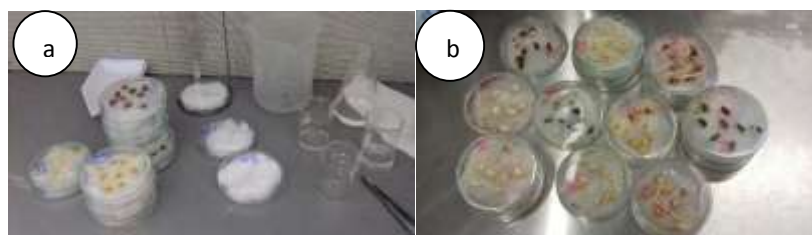


Fig. 6.- Germinación aséptica de las diferentes variedades de semillas a) Siembra en condiciones asépticas, b) coleóptilos obtenidos.

5.4 Extracción de ADN

Reactivos y kits empelados en el desarrollo experimental.

<i>Soluciones de extracción (ANEXO 2)</i>	<i>Electroforesis.</i>	<i>PCR (Kit Sigma-Aldrich)</i>
Agua HPLC	Agarosa	Agua HPLC.
Tris (hidroximetil)aminometano	Agua HPLC	Sol Buffer 10x
HCl ácido clorhídrico.	C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃ bromuro de etidio	Sol MgCl ₂
NaOH hidróxido de sodio	Gen ruler (100pb Thermo Scientific)	DNTPs

EDTA ácido etilendiaminotetraacético	Glicerol	Taq Polimerasa
Etanol 100%	Azul de bromotimol	SSRs
$C_2H_7NO_2$ acetato de amonio		
CTAB Bromuro de hexadeciltrimetilamonio		
NaCl cloruro de sodio		
PVP Polivinilpirrolidona		
Cloroformo		
Alcohol isoamílico		
C_3H_8O Isopropanol absoluto frio		
RNAsa		

La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo la metodología de Doyle & Doyle (1987), así como Dellaporta *et al.* (1983). Fueron pesados 0.2 g de coleóptilo de germinado de las 4 variedades de maíz (rojo, blanco, negro y amarillo), provenientes de 2 productores de Tlachichilpa (la distancia entre los productores fue de 3 km); así como las variedades cultivadas en el Cerrillo (rojo, negro y amarillo) que provenían de las comunidades de Temoaya y Jiquipilco, cada muestra fue molida en morteros con hielo seco y fueron colocadas en microtubos, se agregaron 500 uL de CTAB Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio a cada tubo, se procedió a incubar el extracto durante 15 min a 55°C en baño María. Posteriormente se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min, y se transfirió el sobrenadante a tubos limpios.

Se agregó a cada tubo 250 uL de la solución cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión. Los tubos fueron centrifugados a 13,000 rpm durante 1 minuto. La fase acuosa superior se transfirió a microtubos limpios. A cada uno de los cuales se agregó 50 uL de acetato de amonio 7.5 M, seguido de 200 uL de isopropanol absoluto frio. Los tubos se mezclaron mecánicamente para precipitar el ADN. Se centrifugaron durante 5 min a 13,000 rpm, y se decantó el sobrenadante sin perder el pellet.

Para el lavado de ADN, se agregaron 200 uL de etanol 70% y se centrifugó durante 5 minutos a 13,000 rpm, se eliminó el sobrenadante con micropipetas y se dejaron secar las muestras colocando el tubo boca abajo sobre papel absorbente durante 10 minutos (Fig. 7) y posteriormente 5 minutos en gradillas. El ADN se resuspendió

en 100 μ L de TE Tris-EDTA. Se agregó RNAsa (10 μ g/mL). Después de la resuspensión, el ADN se incubó a 65°C por 20 minutos para destruir RNAsas que pudieran estar presentes.

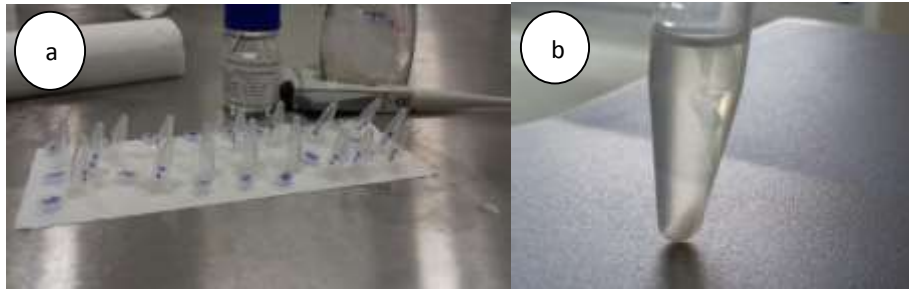


Fig. 7.- Obtención de ADN; a) Secado de ADN después de lavados; durante 10 min. b) Pellet precipitado de ADN genómico.

5.5 Cuantificación y comprobación de la presencia de ADN por electroforesis

El ADN extraído fue diluido a una concentración de 1:100 con TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM), la muestra diluida fue cuantificada por espectrofotometría (Thermo Scientific Genesys G10S-UV-Vis, China), la medición se realizó a 260 nm y 280 nm (ANEXO 3), las determinaciones se realizaron por triplicado, posteriormente se ajustó la solución de ADN a una concentración de 50 μ g/ μ L.

La visualización del DNA obtenido se efectuó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% (p/v), teñido con bromuro de etidio, empleando el procedimiento descrito por Rickwood & Hames (1990). El marcador de peso molecular usado fue de 1000 pb. El gel se corrió a 80 V durante 45 min.

5.6 Amplificación de SSR

Para la amplificación se implementó una modificación a la técnica descrita por Gutiérrez *et al.* (2016), el volumen final de reacción fue 24 μ L, la cual contiene los componentes en orden del master mix presentado en el Cuadro 1. Para la elección de los marcadores SSR, se realizó la búsqueda de SSR afines a las variedades de maíz cónicas previamente reportadas por Corina, *et al.*, (2016). Los marcadores SSR empleados, se encuentran enlistados en el Cuadro 2. La localización de los microsatélites en los cromosomas del maíz usados en este experimento se observa en la Fig. 8, los cuales están distribuidos en 5 diferentes cromosomas del maíz, información obtenida de <https://www.maizegdb.org/>.

Cuadro 1.- Composición de mezcla para PCR

Reactivo	C. Inicial	C. Trabajo	Cantidad (uL) para cada tubo
Agua	-	-	18.25
Buffer 10x	10X	1X	2.5
MgCl ₂	50Mm	2Mm	1
DNTPs	10Mm	0.2Mm	0.5
SSR	10Um	0.25Um	0.625
Taq	5u/UI	0.02u/uL	0.5
DNA	50ng/uL	50ng/uL	1

Cuadro 2.- Marcadores SSR afines a variedades de maíz cónicas.

SSR	F//R
phi109188	AAGCTCAGAAGCCGGAGC// GGTCATCAAGCTCTCTGATCG
phi053	AACCCAACGTA CTCCGGCAG// CTGCCTCTCAGATTCAGAGATTGAC
phi96342	GTAATCCCACGTCCTATCAGCC// TCCA ACTTGAACGAACTCCTC
phi031	GCAACAGGTTACATGAGCTGACGA// CCAGCGTGCTGTTCCAGTAGTT
phi064	CCGAATTGAAATAGCTGCGAGAACCT// ACAATGAACGGTGGTTATCAACACGC

Tomado de Corina, et al., 2016.

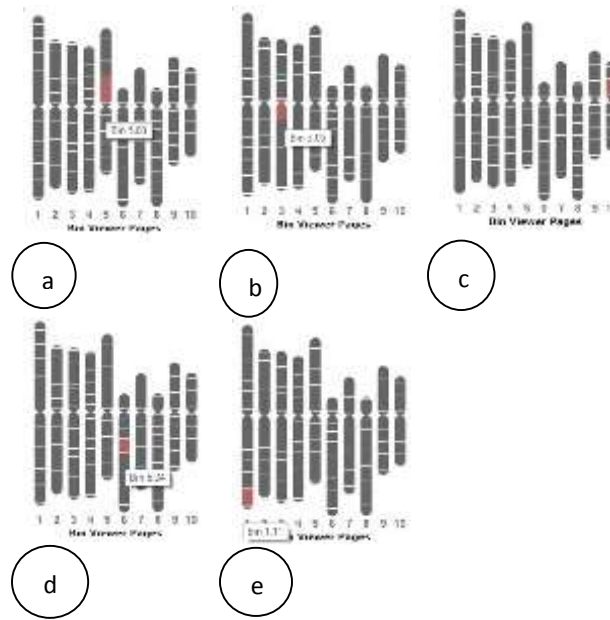


Fig. 8.- Localización de los microsatélites en los cromosomas del maíz; a) phi109188 Bin#: 5.03, b) Phi053 Bin#: 3.05, c) phi96342 Bin#:10.02, d) phi031 Bin#: 6.04, e) phi064 Bin#: 1.11.

La amplificación de los ácidos nucleicos se llevó a cabo en termociclador (Eppendorf AG 22331, Germany) (Fig. 9), utilizando el siguiente programa: Primera desnaturalización (95°C, durante 5 min); 30 ciclos de desnaturalización a 95°C, durante 1 min; con alineación a 65°C, durante 1 min; extensión a 72°C, durante 1.30 min; extensión final (72°C, durante 10 min, 1 ciclo).

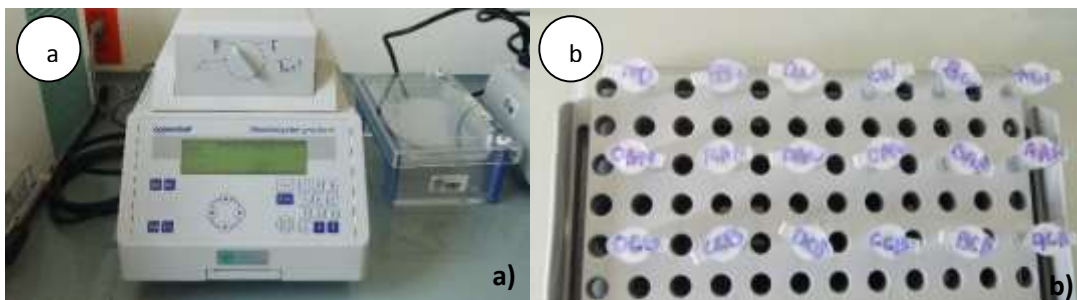


Fig. 9.- PCR a) Termociclador (Eppendorf AG 22331, Germany); b) Microtubos con mezcla master mix para PCR.

5.7 Análisis de microsatélites y construcción de dendrograma

Para el análisis de amplificaciones se tomaron 5 uL del producto de PCR, los cuales se corrieron en gel de agarosa al 2% (p/v), revelando las bandas con bromuro de etidio, para cada reacción de amplificación se registró la presencia o ausencia de bandas amplificadas en una matriz, para detectar marcadores polimórficos. La distancia genética fue estimada por medio del índice de distancia de acuerdo a Rogers, (1972). El análisis de conglomerados se representa en forma gráfica mediante un dendrograma, utilizando la técnica UPGMA con el software DendroUPGMA acorde a Garcia, (1999). Se estimó el flujo génico (N_m) calculándose por el coeficiente (Slatkin & Barton, 1989) y Estadísticos F Statistics con el programa POPGENE versión 3.2.

5.8. Análisis estadístico

Los datos registrados ($n=8$), en las variables de peso, numero de hileras, numero de granos por hilera, largo y diámetro de las mazorcas colectadas, de cada variedad de maíz (negro, blanco, rojo y amarillo), fueron sujetos a un análisis de varianza usando el software estadístico Statgraphics Centurión XVI. Para la comparación de medias se empleó la prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD; con un nivel de 95.0% de confianza).

6. Resultados y Discusión.

El Estado de México ocupa el tercer lugar de productores de maíz a nivel nacional, con una participación de 8.2 por ciento del total. Durante el año agrícola 2015 la composición por tipo de maíz mostro que el 85.9 por ciento de la producción nacional correspondió a maíz blanco, 13.6 por ciento a maíz amarillo y el restante 0.5 por ciento a otros tipos de maíz (SIAP SAGARPA, 2017). De las 25 entrevistas realizadas a productores de Tlachichilpa el 28% siembran otras variedades de maíz a parte del blanco, fue difícil encontrar productores con más ejemplares, los incluidos en este estudio siembran terrenos muy pequeños, menos de una ha en comparación de los grandes productores de maíz híbrido, además de que el 82% de las personas entrevistadas no realiza intercambio mencionando que no desean arriesgar su semilla.

6.1 Caracterización morfológica

En las muestras recolectadas en Tlachichilpa, la variedad amarilla fue la que presento el mayor número de hileras y fue estadísticamente diferente al resto de las variedades analizadas. El valor medio del largo de la mazorca para las variedades amarillas y blancas fue de 17.3 cm, y resultado estadísticamente diferente del valor de las rojas y negras (Cuadro 3). En cuanto al valor del diámetro de la mazorca, el valor medio de las variedades amarillas y blancas (4.5 cm) fue estadísticamente diferente de las rojas y negras. La variedad roja, fue la muestra que presentó el mayor porcentaje de colores de grano diferentes, con 9.049 ± 4.124 % de granos negros.

Para las variedades cultivadas en El Cerrillo el análisis de comparación de medias del número de hileras muestra una similitud estadística entre las tres. La variedad negra resulto ser la de menor diámetro 4.1 cm y estadísticamente diferente a las otras (Cuadro 3). El valor medio en cuanto al largo de las variedades amarilla y roja fue de 19 cm, y resulto estadísticamente diferente a las variedades negra y amarilla. Mientras que la variedad que mostró el mayor porcentaje de colores de grano diferentes fue la roja, con 2.38 ± 0 % de granos amarillos, este entrecruzamiento pudo

deberse a que éstas variedades fueron sembradas en el mismo terreno y probablemente empataron su ciclo de floración.

Las variedades rojas, amarillas y negras de las dos comunidades resultaron estadísticamente similares en cuanto al número de hileras, contrario a los estudios de maíz en diferentes ambientes en E.U.A y el Caribe quienes identificaron que los caracteres suficientemente estables para ser considerados como criterios de clasificación racial incluyen: el número de hojas por mazorca, tamaño de espiguillas masculinas y número de hileras (Sánchez, 2011). Los rangos de número de hileras para todas las variedades se encuentran dentro de los establecidos para variedades cónicas (CONABIO, 2012).

Cuadro 3. Caracterización morfológica de muestras de mazorcas de maíz Tlachichilpa.

Variedad	Peso [kg]		Número de hileras		Número de granos por hilera		Largo [cm]		Diámetro [cm]		% de Color: granos diferentes	
	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C
Roja	0.171±0.013b	0.269±0.031a	15±1.095c*	14.6±3.055a*	27.5±3.016b	36±5.291a	13.96±0.408b	19±2.291 a	3.916±0.466b	4.5±0.353a	9.049±4.124 granos negros	2.38±0 granos amarillos
Amarilla	0.172±0.037b	0.234±0.027a	18±0a*	16±2a*	31±5.865a	35.6±6.658b	16.716±1.892a*	18.1±2.837ba*	4.3±0.613a*	4.34±0.230ba*	1.394±1.128 granos blancos	1.26±0 granos blancos
Negra	0.162±0.013b	0.203±0.015b	16.3±1.966b*	16.6±1.154a*	27.3±3.881b*	29.6±4.725c*	13.9±0.889b*	16.16±1.892b*	3.7±0.167b	4.1±0.173b	0.302±0.740g granos rojos	0.823±0.256 granos rojos
Blanca	0.23±0.046ab		16.6±2.065b		29.16±2.041ab		18.483±3.608a		4.541±0.694 ^g		0.621±0.704 granos negros	

Los datos representan (n=8) media ± la desviación estándar de cada característica. Valores con la misma letra para cada columna, no son significativamente diferentes. Fisher (LSD; con un nivel de 95.0% de confianza).

6.1.1 Dendrograma características morfológicas Tlachichilpa.

En el dendrograma construido mediante el cálculo de distancia euclidiana con datos morfológicos dentro de la comunidad de Tlachichilpa (Fig. 10) se observaron 2 grupos principales, 6 ramificaciones y 14 subgrupos, los maíces blancos de AR se localizaron en dos subgrupos diferentes pero ubicados en una misma rama separada de ARB1 con una distancia de 0.007. Para el caso de las variedades blancas MSB1 y MSB2 se encontraron en un mismo subgrupo, mientras MSB3 se localizó a una distancia de 0.036. Las mazorcas rojas de MS se distribuyeron en un mismo subgrupo, mientras que las variedades rojas del productor AR se

encontraron en subgrupos diferentes alejado al menos con distancias genéticas de 0.004. Las mazorcas amarillas de AR se distribuyeron cada una en diferentes ramificaciones con distancias mínimas de 0.024, mientras que las de MSA3 Y MSA2 se localizaron en una misma ramificación, y diferente subgrupo, MSA1 se encontró a una distancia de 0.031. Las mazorcas negras de AR se encontraron en una misma ramificación y diferente subgrupo. Las mazorcas negras de MSN1 Y MSN2 se localizaron en una misma ramificación, no así MSN3 lejana a ellas por una distancia de al menos 0.075 (Fig.10.).

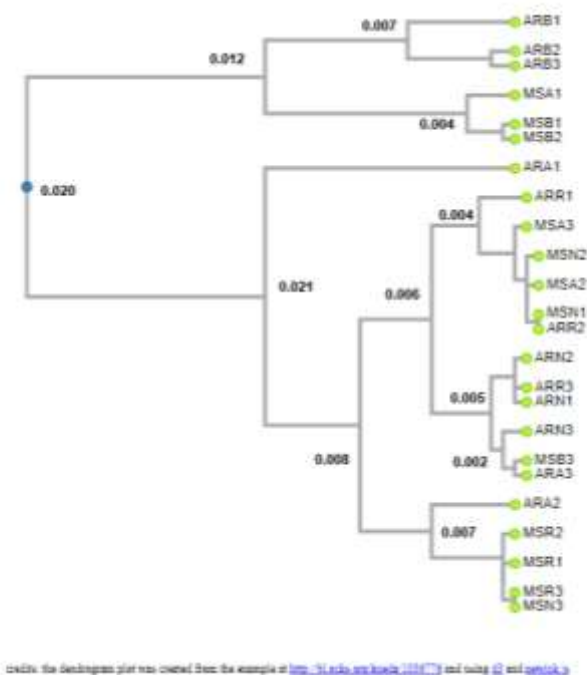


Fig. 10.- Dendrograma: Distancias euclidianas: características morfológicas de las diferentes variedades de maíz: Tlachichilpa (ANEXO 4). MS: María S, AR: Alfredo R,

6.1.2 Dendrograma características morfológicas Cerrillo.

Para el cálculo de distancias euclidianas de las variedades cosechadas en el Cerrillo (Fig.11) se generaron 2 grupos principales, 4 ramificaciones y 6 subgrupos, las muestras rojas se encontraron R2 y R3 en una misma rama, R1 distal por al menos 0.016, A1 Y A2 se localizaron en un mismo subgrupo siendo las variedades más parecidas en cuanto a sus características morfológicas 0.001, mientras que A3 se

ubicó en una ramificación diferente. Por otro lado, N1 y N2 se distribuyeron en una misma rama y N3 en una ramificación distal por al menos 0.014. Se observó que ambas comunidades, Tlachichilpa y Cerrillo, muestran diversidad morfológica en cuanto a sus variedades.

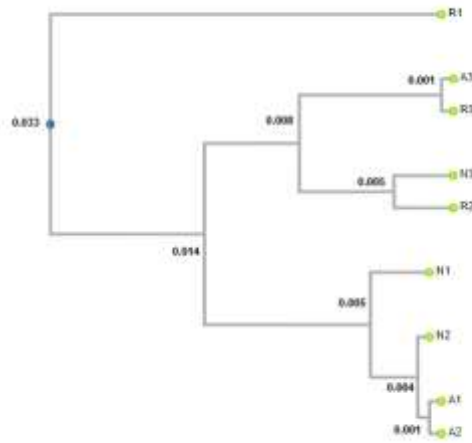


Fig. 11.- Dendrograma: Distancias euclidianas: características morfológicas de las diferentes variedades de maíz: Cerrillo (ANEXO 4). A: Amarilla, R: Roja, N: Negra.

6.2 Análisis SSR's.

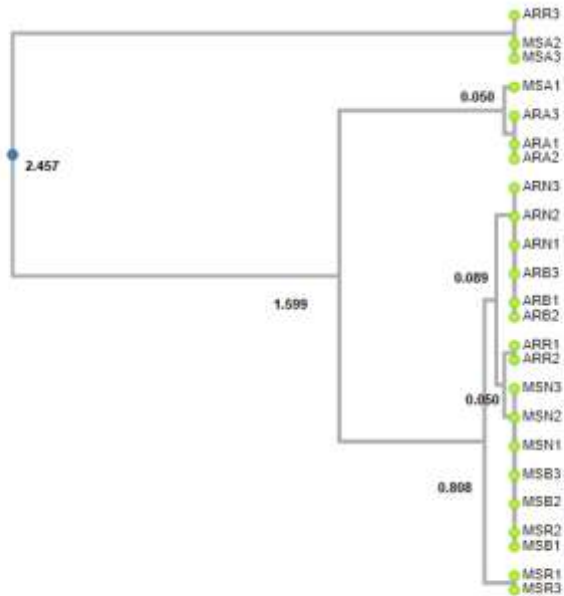
En la técnica de SSR's se evaluaron 5 pares de iniciadores, los cuales produjeron para el análisis dentro de población (Tlachichilpa) un total de 106 productos (bandas en promedio), mientras que para las variedades del Cerrillo fueron 32 bandas. El tamaño de los fragmentos observados estuvo en el rango de (48.289-300 pb) (ANEXO 5).

6.2.1 Dendrograma Distancia genética Tlachichilpa

Las relaciones genéticas para cada sistema de marcador fueron calculadas utilizando la matriz de distancia propuesta por Rogers, en este dendrograma para las variedades de Tlachichilpa (Fig.12), construido mediante SSR se generaron 2 grupos principales, 4 ramificaciones y 7 subgrupos, las variedades amarillas de MS se localizaron dos en un mismo subgrupo y MSA1 en una ramificación con distancia

de 1.8, las muestras amarillas de la variedad de AR se distribuyeron en un mismo subgrupo lo cual nos sugiere que la semilla no presentó entrecruzamiento con ninguna otra variedad. Las variedades rojas de ARR1, ARR2 se ubicaron en un mismo subgrupo, mientras ARR3 se encontró en una rama distante a 2.6 siendo el más alejado, lo que sugiere que posiblemente el embrión fue fertilizado por una variedad vecina de polen transportada por el viento y no a las que se tenían en el estudio. MSR1 y MSR3 están ubicadas en el mismo subgrupo, MSR2 en otra ramificación cercana a ellas con una distancia de 0.100. Las variedades negras y blancas de AR se localizan en un mismo subgrupo, esta situación se repitió con las variedades negras y blancas de MS. Esta información sugiere que no ha habido un mayor intercambio genético entre sus variedades durante varios ciclos de cultivo, siendo indicativo de que está ocurriendo endogamia entre ellas, lo cual resulta probable ya que los ciclos de reproducción y de siembra de estas dos variedades se equiparan, ambas con maduración de 8 meses y de acuerdo a las entrevistas fueron sembradas al mismo tiempo y en el mismo sitio.

Un estudio en San Felipe del Progreso registra que la siembra comienza a partir de marzo y de acuerdo a las variedades identificadas por el campesino se conocen como: de ciclo corto, intermedio y largo, el maíz blanco (ciclo largo) se siembra en el mes de marzo, seguido de la variedad negra y amarilla (intermedio) y finalmente en el mes de mayo se siembran la variedad roja y rosada (ciclo corto). El Cuadro 4 se observan las fechas de siembra por variedad. Además, este mismo estudio de uso de diversidad de maíz en San Felipe, menciona que en la comunidad de Tlachichilpa la mayor parte de los campesinos cultivan en proporción 50% maíz blanco, 50% negro o amarillo y las otras variedades de color en las orillas de las milpas de 10 a 15 surcos (Castillo, 2016), ésta proporción explica la relación filogenética entre la variedad negra y blanca. Sin embargo, las variedades blancas y negras de MS contra las blancas y negras de AR no son las mismas, se diferencian por una distancia de (0.089).



credit: the dendrogram plot was created from the example at <http://31.426.242.104/101477/> and using [d3](#) and [dendextend](#).

Fig. 12.- Dendrograma: Relaciones genéticas de las diferentes variedades de maíz, obtenidas por índice de Rogers. Tlachichilpa MS: Maria S, AR: Alfredo R.

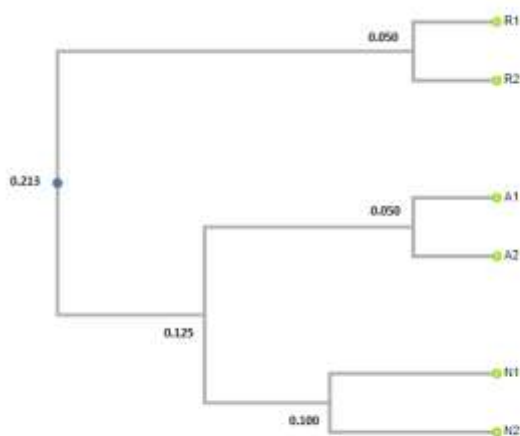
Cuadro 4.- Fechas de siembra y tiempo de maduración por variedad en los ejidos de San Pedro el Alto y San Pablo Tlachichilpa.

Variedad en San Pedro	Mar	Marzo			Abril				Mayo				Maduración	Cosecha	
	Semana	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3			4
Bianco			X	X	X									8 a 9 meses	noviembre-diciembre
Negro			X	X	X									8 meses	Octubre
Amarillo			X	X	X									8 meses	Octubre
Rajo				X	X	X	X	X	X					7 meses	Septiembre
Rosado				X	X	X	X	X	X						
Pinto				X	X	X	X	X	X					7 meses	Septiembre
Cuarenta (híbrido)			X	X	X	X	X	X	X						
Variedad en San Pablo															
Bianco				X	X	X								8 a 9 meses	noviembre-diciembre
Negro				X	X	X								8 meses	septiembre-octubre
Amarillo				X	X	X	X							8 meses	Octubre
Amarillo Zenthoris				X	X	X	X								
Rosado						X	X	X	X					7 meses	Septiembre

Tomado de Castillo (2016).

6.2.2 Dendrograma Distancia genética Cerrillo

El dendrograma de distancias genéticas por distancia de Rogers (Fig.13) para las variedades cosechadas en el Cerrillo genero 2 grupos principales, 3 ramas (una para cada variedad) y 6 subgrupos, relacionando con una distancia de 0.125 a las variedades amarillas y negras (ambas de ciclo intermedio) y distales 0.213 de las rojas (ciclo corto) la cual tendría menor entrecruzamiento debido a que no equipara en ciclo de fertilización con las otras dos. A pesar de que existe intercambio de semilla entre dos hermanos de dos poblaciones distintas, las variedades se siembran al mismo tiempo y en un mismo terreno lo cual podría ser una razón de que las muestras se agruparon en el dendrograma como un solo grupo. Otros trabajos para variedades cónicas reportan distancias genéticas de maíz criollo proveniente de Tlaxcala que van de 0.80-0.94 (Hernández, 2017), las distancias genéticas observadas en el presente estudio, fueron mayores para algunos de los casos.



realiza: las distancias genéticas de las variedades de maíz se obtienen a través de <https://www.genetree.org/> con el índice de Rogers.

Fig.13- Dendrograma: Relaciones genéticas de las diferentes variedades de maíz, obtenidas por índice de Rogers. Cerrillo A: Amarillo, R:Rojo, Negro: N.

Matriz de distancias genéticas Cerrillo por índice de Rogers. OTU representados verticalmente y horizontalmente.

	N1	N2	A1	A2	R1	R2
N1	0	0.200	0.500	0.400	0.200	0.300
N2		0	0.300	0.200	0.400	0.500
A1			0	0.100	0.700	0.800
A2				0	0.600	0.700
R1					0	0.100
R2						0

El análisis en los dos experimentos muestra diferencias en el Dendrograma de distancias morfológicas y distancias genéticas. Las distancias entre las variedades son diferentes, debido a que las características fenotípicas del maíz como el largo y peso de la mazorca dependen de factores como su constitución genética, además de las condiciones de suelo y del clima en donde se ha establecido el cultivo, lo mismo menciona en su estudio Wilmer (2009), realizado en Maracay Venezuela, en el que fueron evaluadas las mismas características morfológicas en maíz amarillo frente a condiciones climáticas diferentes y en diferentes épocas del año, en este estudio observaron que las líneas son un tanto afectadas en la expresión de sus características así como en su periodo de floración de acuerdo en la época en la que son sembradas.

Las variedades blanca y negra presentaron un valor de flujo génico mayor ($N_m = 0.375, 0.362$, respectivamente), la variedad roja presentó el menor flujo génico $N_m = 0.058$ (Cuadro 5). El flujo génico para las variedades resultó ser menor que 1 por lo que puede decirse que existe diferenciación genética entre ellas. El número estimado de individuos que migran por generación fue menor al 3.40, flujo génico menor registrado para maíces criollos Loxixha, Oaxaca Aragón (2007), comunidad en la cual se reporta que sus variedades están poco diferenciadas genéticamente por la selección de semillas que se lleva cabo en esta comunidad. La variación génica observada entre las variedades estudiadas de las comunidades puede deberse un tanto a las prácticas como al intercambio genético por polinización abierta del maíz con plantas cercanas.

Cuadro 5.- F-Statistics Y Flujo Génico.

	Fis	Fit	Fst	Nm
Negro	0.6961	0.8202	0.4083	0.3623
Blanco	1.0000	1.0000	0.4000	0.3750
Roja	1.0000	1.0000	0.8104	0.0585
Amarilla	0.2852	0.7271	0.6182	0.1544

$Nm = 0.25(1 - Fst)/Fst$. Fis= correlación entre los genes de los individuos y los de la subpoblación, Fit= endogamia total, Fst= correlación entre los genes de la subpoblación y los de la población total.

La introducción de maíz híbrido en lugar del criollo es de los factores principales que impiden la diversidad genética, en los años 70, híbridos en Texas desarrollaron una gran susceptibilidad al hongo *Helmithosporium maydis* raza T, que puso en grave riesgo la producción de maíz en ese país (Elena R, 2003), siendo una de las consecuencias de la endogamia, es por esta razón que es importante la conservación de la diversidad. Las ventajas que tienen los maíces criollos son adaptación a diferentes alturas sobre el nivel del mar, a regímenes climáticos y sus variantes (precipitación y temperatura), rendimiento en condiciones adversas, tolerancia a plagas y enfermedades, variedades con alta calidad de proteína, alto contenido de aceite en el germen, adaptación a hiperacidez e hiperalcalinidad del suelo (Elena R, 2003). Los resultados obtenidos sugieren que la diversidad de maíz depende de las prácticas de productores, de su conocimiento de ciclos de fertilización del maíz, así como la práctica de intercambio de la semilla que es importante para el cruzamiento de genes entre variedades, SEMARNAT (2006) lanzó el Programa de Conservación de Maíz Criollo en México, mencionando la importancia que tienen los agricultores como custodios de la diversidad biológica del maíz criollo.

7. Conclusiones

El dendrograma construido mediante el cálculo de distancias euclidianas para ambos experimentos generó una distribución de las variedades de maíz, sin embargo, genéticamente la distribución resultó ser diferente, debido a que las características fenotípicas del maíz dependen de factores genéticos, ambientales, del lugar y época donde fue establecido el cultivo.

La construcción de un dendrograma mediante SSR mostró que las variedades negras y blancas de Tlachichilpa no reflejan diversidad. De todas las variedades el mayor flujo génico lo mostró el maíz blanco, con $N_m = 0.375$ individuos que migran por generación.

Que significa que el valor de N_m sea bajo, aun no queda claro.

[EN in English](#) [imprimir](#)

Flujo génico

El [flujo génico](#) — también llamado migración — es cualquier desplazamiento de genes desde una población hasta otra. El flujo génico incluye multitud de tipos de sucesos diferentes, como el polen que es transportado por el aire hasta un nuevo destino o las personas que se trasladan a otra ciudad o país. Si unos [genes](#) son transportados hasta una población donde esos genes no existían previamente, el flujo génico puede ser una fuente muy importante de variabilidad genética. En el gráfico de abajo, el gen para la coloración marrón se traslada de una población a otra.

8. Recomendaciones

Valdría la pena realizar un mayor muestreo y realizar un estudio a las variedades blanca y negra y observar si los productores están generando endogamia entre estas dos variedades.

9. Referencias

ANDERSON E, CUTLER H.C. (1942). Races of *Zea mays*. Their recognition and classification. Ann. Mo. Bot. Gard.

ARAGÓN M.C. (2007). Variación genética en maíces criollos de la región Loxicha, Oaxaca. Tesis. México.

BERGVINSON D, RAMÍREZ A, FLORES. D, et. al., (2007). Mejoramiento De Maíces Criollos Por Integración De Alelos. México, D.F.: CIMMYT. ISBN: 970-648-153-2.

CASTILLO J. (2016). Conservación De La Diversidad Del Maíz En Dos Comunidades De San Felipe Del Progreso, Estado De México. México. 13: 217-235. 2016.

CIMMYT (CENTRO INTERNACIONAL DE MEJORAMIENTO DE MAÍZ Y TRIGO). (2006). Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. 3ª. ed. El Batán, Texcoco, México. 100 p.

CONABIO Website. Razas De Maíz De México. Recuperado De: [Http://Www.Biodiversidad.Gob.Mx/Usos/Maices/Razas2012.Html](http://www.biodiversidad.gob.mx/Usos/Maices/Razas2012.html)

CONANP. 2016. Programa de Conservación de Maíz Criollo en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México.

CONCEPCIÓN J, PUERTA B, et al., (2005). Prácticas de Biología Molecular. Pontificia Universidad Javeriana. ISBN: 978-958-683-764-5.

CORINA H, OCTAVIO M, et al., (2016). An SSR- based approach incorporating a novel algorithm for identification of rare maize genotypes facilitates criteria for landrace conservation in Mexico. Cinvestav.

CORNEJO A, SERRATO A, RENDÓN B, et al., (2014). Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología: Aspectos Teóricos Y Prácticos. México DF: Secretaría De Medio Ambiente Y Recursos Naturales (Semarnat). ISBN: 978-607-8246-72-4.

CRUZ M. (2011). Comparación Del Ciclo Agrícola Actual Con El De Hace Unos Diez Años En San Juan Jalpa Municipio San Felipe Del Progreso Estado De México: Evidencia De Adaptación Al Cambio Climático. Universidad Autónoma Indígena De México.

DELLAPORTA SL, WOODJ, & HICKS JB. (1983). A Plant DNA Mini preparation Version II. Plant Molecular Biology Reporter. 18: 61-64 Pp. Revista Argentina de antropología biológica 11(1):73-88 (2009).

DEMARCHI A. (2009). Microsatélites, distancias genéticas y estructura de poblaciones nativas sudamericanas.

DOYLE JJ & DOYLE JL. (1987). A Rapid DNA Isolation Procedure For Small Quantities Of Fresh Leaf Tissue. Phytochem. Bull. 19:11-15 Pp.

ENDICOTT S. (2015). Maíz crecimiento y Desarrollo. DuPont Pioneer.

GARCÍA R. (2007). Las Huellas De La Evolución. Impreso En España Por Publicaciones Digitales S.A. ISBN: 978-1-4092-0288-2.

GARCÍA S. (1999). Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Molecular Biology and Evolution* 16(9):1125-1134. UPGMA Website. <http://genomes.urv.cat/UPGMA/index.php?entrada=Example2>

GONZALEZ. (2003). Microsatélites: Sus Aplicaciones En La Conservación De La Biodiversidad. Madrid España. 59(2-3): 377-388.

GONZÁLEZ ME. (2012). Análisis De Diversidad Genética Interpoblacional E Intraracial Utilizando Marcadores SSR En Maíces Mexicanos. Tesis.

GUACHO E. (2014). Caracterización Agro-Morfológica Del Maíz (Zea Mays L.) De La Localidad San José De Chazo. Ecuador. Tesis.

GUTIÉRREZ GF, GARCÍA E, ARELLANO JL, Et. Al., (2009). Comparación Molecular De La Identidad Genética De Genotipos De Maíz De Diferente Edad. México. Agronomía Mesoamericana. 20(1): 01-09.

GUTIÉRREZ JA, RAMÍREZ JG, RAYA JA, et al. (2016). Variabilidad Genética de Líneas Endogámicas de Maíz Comparadas con Progenitores Criollos mediante Microsatélites. ISSN: 1405-5597.

HERNÁNDEZ MA. (2017). CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MAÍCES LOCALES DE LA RESERVA DE LA BIOSFERA LA SEPULTURA, MÉXICO. ISSN 2215-3608

IICA-BID- PROCIANDINO. (1991). XIII Curso corto. Mejoramiento Genético del Maíz. Ecuador. p180.

INEGI. (1997). El Maíz En Estado De México. ISBN 970-13-1821-8

KATO T. (2009). Origen y Diversificación del maíz, Una revisión analítica. Mexico, DF. UNAM. ISBN:978-607-02-0684-9.

Koh M.C, Lim C.H, Chua S.B, Chew S.T, Phang S.T.W. (1998). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species,48:275–285

LEMEY. (2009). The Phylogenetic Handbook. Cambridge University Press. ISBN-13 978-0-511-71963-9

LODISH H, BERK A, MATSUDAIRA P. (2005). Biología Celular Y Molecular. Editorial Médica Panamericana. Quinta Edición. ISBN:950-06-1374-3.

LOUETTE, D. 1995. Intercambio de semillas entre agricultores y flujo genético entre variedades de maíz en sistemas agrícolas tradicionales. INIFAP-CIMMYT-CNBA. El Batán, Estado de México.

MAIZEGDB. Recuperado de : <https://www.maizegdb.org/>

Montaño K. Villalpando E, Vargas F. (2006). AFLP (*AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM*) Y SU APLICACIÓN EN ACUICULTURA. Caracas. ISSN 0378-1844.

QUESADA S. (2007). Manual de Experimentos de Laboratorio para Bioquímica. UENED. Primera edición. C.R. ISBN:978-9968-31-616-3.

PASSARGE. (2007). Genética: Texto Y Atlas. Madrid España.

PIÑERO D. (2008). La Diversidad Genética Como Instrumento Para La Conservación Y El Aprovechamiento De La Biodiversidad: Estudios En Especies Mexicanas. México. En Conocimiento Actual De La Biodiversidad. (415-494). CONABIO.

R E. (2003). El maíz en peligro ante los transgénicos. Un análisis integral sobre el caso de México. UNAM.

RICE E, SMALE M, BLANCO J.L. (1998). Farmers' use of improved seed selection practices in Mexican maize: Evidence and issues from the Sierra de Santa Marta. *World Development* 26(9): 1625-1640.

RICKWOOD D & HAMES BD. (1990). Gel Electrophoresis Of Nucleic Acids: A Practical Approach. Oxford University Press. New York. U.S.A. 65-66 Pp

RINCON F. (2010). Guía Práctica para la Descripción Preliminar de Colectas de Maíz. Proyecto Global de Maíces Nativos. CONABIO.

RIPUSUDAN L. (2001). El maíz en los trópicos. Mejoramiento y Producción. Roma: FAO.

ROCARDIO M. (2014). Caracterización Morfológica Y Agronómica De Siete Razas De Maíz De Los Valles Altos De México. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 37 (4): 351 - 361, 2014.

ROGERS JS. (1972). Measures of genetic similarity and genetic distances. *Studies in Genet* VII 7213:145-153.

RUIZ J A, SÁNCHEZ. J.J, HERNÁNDEZ. J.M. et Al., (2013). Identificación De Razas Mexicanas De Maíz Adaptadas A Condiciones Deficientes De Humedad Mediante Datos Biogeográficos. En *Rev. Mex. Cienc. Agríc* (No.6). Texcoco: ISSN 2007-0934.

SIAP SAGARPA. Sitio web: <https://www.gob.mx/siap>.

SAGARPA. (2017). Fortalece México autosuficiencia en la producción de maíz blanco. Boletín.

SAIN G. (1997). Producción De Maíz Y Políticas Agrícolas En Centro América Y México. Instituto Interamericano De Cooperación Para La Agricultura (IICA). ISBN 92-9039-326 2.

SÁNCHEZ J J. (2000). Isozymatic And Morphological Diversity In The Races Of Maize Of México. Economic Botany. 54(1): 43–59.

SÁNCHEZ G.J.J. (2011). Diversidad del Maíz y el Teocintle. Informe preparado para el proyecto: “Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México”. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Manuscrito.

SLATKIN M Y N.H. BARTON. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. Evolution 43:1349-1368.

VINUESA P. (2016). Correlación: Teoría y Práctica. CCG.UNAM.

WILMER R. (2009). Evaluación de las características morfológicas y agronómicas de cinco líneas de maíz amarillo en diferentes fechas de siembra. SSN-e 1317-9152.

10. ANEXOS

ANEXO 1

Formato entrevistas.

Nombre de la Comunidad: Tlachichilpa.	
Nombre:	María Soledad González García.
1.- ¿Cuál es la superficie de siembra? a) ½ha b) <u>1ha</u> c) 2ha	2.- ¿Qué cantidad de semilla siembra? 12 cuartillos
3.- ¿Cuáles son sus rendimientos de cultivo? 80 costales 50kg	4.- ¿Cuántas razas diferentes siembras? 4
5.- ¿Qué razas y en qué proporción? Ejido: blanco, negro; casa: rojo, amarillo	6.- ¿Cuáles son sus ciclos de siembra? a) ene b) feb c) <u>mar</u> d) abr e) may f) jun
7.- ¿Qué tipo de agricultura realiza? a) de riego b) <u>temporal</u>	8.- ¿Utiliza algún tipo de fertilizante, ¿cuál? Abono, estiércol
9.- ¿Realiza intercambio de semillas? a) <u>si</u> b) no	10.- ¿Con quién realiza el intercambio? Entre vecinos
11.- ¿Las razas que siembra son criollas? a) <u>si</u> b) no	12.- ¿Qué uso les da a sus variedades criollas? a) <u>alimento propio</u> b) <u>alimento para ganado</u> c) venta

13.- ¿Maneja razas híbridas? a) si b) <u>no</u>	14.- ¿Qué variedades siembran a la redonda? Las mismas
--	---

Nombre de la Comunidad: Tlachichilpa.	
Nombre:	Alfredo Ruiz.
1.- ¿Cuál es la superficie de siembra? a) ½ha b) <u>1ha</u> c) 2ha	2.- ¿Qué cantidad de semilla siembra? 8 cuartillos
3.- ¿Cuáles son sus rendimientos de cultivo? 60 costales (50kg)	4.- ¿Cuántas razas diferentes siembras? 4
5.- ¿Qué razas y en qué proporción? ½ ha: blanco, negro ½ ha: rojo, amarillo	6.- ¿Cuáles son sus ciclos de siembra? a) ene b) feb c) <u>mar</u> d) abr e) may f) jun
7.- ¿Qué tipo de agricultura realiza? a) de riego b) <u>temporal</u>	8.- ¿Utiliza algún tipo de fertilizante, ¿cuál? Fertilizante químico.
9.- ¿Realiza intercambio de semillas? a) si b) <u>no</u>	10.- ¿Con quién realiza el intercambio? Se siembra la misma semilla para no arriesgar la cosecha, (por el tipo de tierra)
11.- ¿Las razas que siembra son criollas? <u>a)si</u> b) no	12.- ¿Qué uso les da a sus variedades criollas? <u>a) alimento propio</u> b) alimento para ganado c) venta
13.- ¿Maneja razas híbridas? a) si b) <u>no</u>	14.- ¿Qué variedades siembran a la redonda? Las mismas, además de rosado

ANEXO 2

Preparación de soluciones Stock

TRIS 1M 500ml	EDTA 0.5M 500ml.
PM TRIS: 121.14g/mol $M = \frac{n}{L}$ $n = (1M)(0.5l) = 0.5 \text{ mol}$ $0.5 \text{ mol} \frac{121.14g}{\text{mol}} = 60.57g$ Disolver en agua HPLC y aforar a 500ml, ajustar pH a 8.0, si no es así agregar HCl u NaOH. Se esteriliza la solución.	PM EDTA: 372.24g/mol $n = (0.5M)(0.5l) = 0.25 \text{ mol}$ $0.25 \text{ mol} \frac{372.24g}{\text{mol}} = 93.06g$ Disolver en agua HPLC y aforar a 500ml, ajustar pH a 8.5, si no es así agregar HCl u NaOH.
ETANOL 70% 100ml	Sol Acetato de Amonio 7.5M 100ml.
$70\% \frac{100ml}{100\%} = 70ml$ Aforar a 100ml con agua HPLC.	PM Acetato: 77.08g/mol $n = (7.5M)(0.1l) = 0.75 \text{ mol}$ $0.75 \text{ mol} \frac{77.08g}{\text{mol}} = 57.81g$ Disolver en agua HPLC y aforar a 100ml en probeta.
Sol CTAB 250ml	Buffer TE 100ml
CTAB 5g TRIS pH8 25ml	1M TRIS 1ml 0.5M EDTA 0.2ml

<p>EDTA 0.5M 10ml NaCl 5M 20.45ml PVP 2.5g NaCl 5M PM NaCl: 58.44g/mol $n=(5M)(0.1l)=0.5mol$ $0.5mol \frac{58.44g}{mol}=29.22g$ Disolver en agua HPLC y aforar a 250ml en probeta.</p>	<p>Aforar a 100ml con agua HPLC.</p>
<p>TAE 500ml 50X</p>	<p>Cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) 100ml</p>
<p>TRIS 1M 60.5ml Acetato 7.5M 14.3ml EDTA 0.5M 25ml Aforar a 100ml con agua HPLC y esterilizar.</p>	<p>4ml alcohol isoamilico 96ml cloroformo</p>
<p>Buffer de carga</p>	
<p>600ul glicerol Pizca con punta de azul de bromotimol 400ul TAE 1X</p>	

ANEXO 3

Calidad de Extracción ADN.

Relación de lecturas espectrofotométricas: Tlachichilpa.

	lectura espectrofotométrica 260 nm	lectura espectrofotométrica 280 nm	Relación de pureza ADN [260nm]/[280nm]	Concentración [ADN]ug/ul
Blanca	0.133±0.006	0.074±0.003	1.797±0.018	680±31.870
Roja	0.128±0.007	0.071±0.004	1.806±0.018	644.411±39.681
Negra	0.133±0.004	0.074±0.002	1.800±0.011	667.647±24.566
Amarilla	0.127±0.002	0.070±0.001	1.800±0.010	637.058±12.997

Los datos representan (n=8) la media ± la desviación estándar de cada característica. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes.

Relación de lecturas espectrofotométricas El Cerrillo.

	lectura espectrofotométrica 260 nm	lectura espectrofotométrica 280 nm	Relación de pureza ADN [260nm]/[280nm]	Concentración [ADN]ug/ul
--	--	--	--	-----------------------------


Roja	0.131±0.003	0.072±0.002	1.805±0.011	657.5±15.732
Negra	0.129±0.005	0.072±0.002	1.800±0.012	648.333±27.688
Amarilla	0.129±0.003	0.071±0.002	1.807±0.012	647.5±18.096
















Los datos representan (n=8) la media ± la desviación estándar de cada característica. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes.

ANEXO 4.

Muestras colectadas.




Variedades colectadas, representativas al grupo (cónico) de la comunidad de Tlachichilpa San Felipe del Progreso, las cuales fueron elegidas como muestras de acuerdo a sus características morfológicas.

Muestras de maíz comunidad de Tlachichilpa (San Felipe del Progreso)			
Variedad.	María Soledad (MS).		
Roja.			

Amarilla.			
Negra.			
Blanca.			
Variedad	Alfredo Ruiz (AR)		
Roja.			
Amarilla.			

Negra.			
Blanca.			

Variedades colectadas, representativas al grupo (cónico) cultivadas en el Cerrillo y provenientes de las comunidades de Temoaya y Jiquipilco.

Muestras de maíz Cerrillo.			
Variedad.			
Roja.			



ANEXO 5.

Amplificación con SSR.

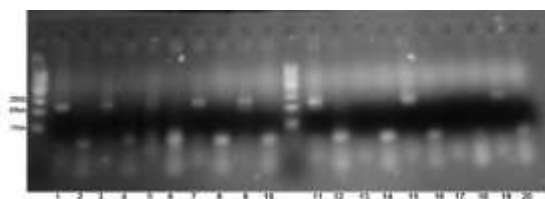


Fig14.- Amplificación mediante SSR [Tlachichilpa], para los pozos (1,3,5,7,9,11,13,15,17,19) se usaron los pares de iniciadores phi031, phi9634. Para los pozos (2,4,6,8,10,12,14,16,18,20) phi64, phi053, phi109. Pozos HIBR (1,2), MSR1 (3,4), MSR2 (5,6), MSR3 (7,8), MSB1 (9,10), MSB2

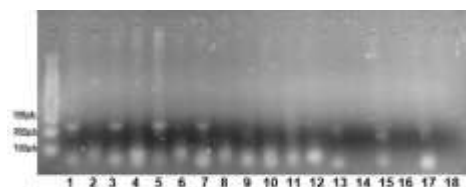


Fig15.- Amplificación mediante SSR [Tlachichilpa], para los pozos (1,3,5,7,9,11,13,15,17) se usaron los pares de iniciadores phi031, phi9634. Para los pozos (2,4,6,8,10,12,14,16,18) phi64, phi053, phi109. Pozos ARR1 (1,2), ARR2 (3,4), ARR3 (5,6), ARB1 (7,8), ARB2 (9,10),

(11,12), MSB3 (13,14), MSN1 (15,16), MSN2 (17,18), MSN3(19,20).

ARB3 (11,12), ARN1 (13,14), ARN2 (15,16), ARN3 (17,18).

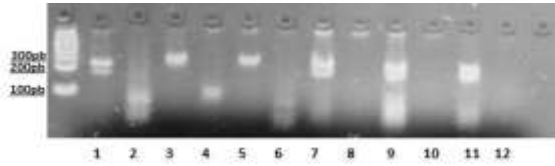


Fig16.- Amplificación mediante SSR [Tlachichilpa], para los pozos (1,3,5,7,9,11) se usaron los pares de iniciadores phi031, phi9634. Para los pozos (2,4,6,8,10,12) phi64, phi053, phi109. Pozos MSA1 (1,2), MSA2 (3,4), MSA3 (5,6), ARA1 (7,8), ARA2(9,10), ARA3 (11,12).

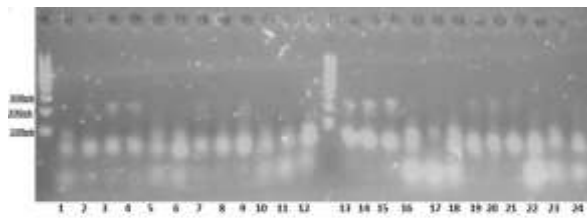


Fig17.- Amplificación mediante SSR [Cerrillo], para los pozos (1,2,3,7,8,9,13,14,15,19,20,21) se usaron los pares de iniciadores phi031, phi9634. Para los pozos (4,5,6,10,11,12,16,17,18,22,23,24) phi64, phi053, phi109. Pozos N1 (1-6), N2 (7-12), A1 (13-18), A2 (19-24).

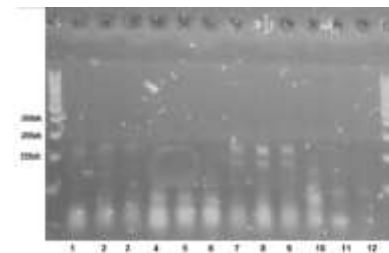


Fig18.- Amplificación mediante SSR [Cerrillo], para los pozos (1,2,3,7,8,9) se usaron los pares de iniciadores phi031, phi9634. Para los pozos (4,5,6,10,11,12) phi64, phi053, phi109. Pozos R1 (1-6), R2 (7-12).