



# UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

## FACULTAD DE AGRONOMÍA

### Trabajo de Graduación

Por un Desarrollo  
Agrario Integral  
y Sostenible

**Evaluación molecular de tres generaciones;  $G_0$ ,  $G_2$ ,  $G_3$  , del maíz criollo pujagua rojo, utilizando 15 cebadores microsatelitales tipo SSR, CNIA–INTA, Nicaragua**

### AUTORES

**Br. Joshua Marcell Lacayo Solórzano**  
**Br. Moisés Alejandro Ponce Ruíz**

### ASESORES

**Dr. Carlos Henry Loáisiga Caballero**  
**MSc. Andrea Zamora Jarquin**  
**Ing. Ricardo Javier Bolaños Pérez**

**Managua, Nicaragua**  
**Septiembre, 2018**



“Por un Desarrollo Agrario  
Integral y Sostenible”

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**TRABAJO DE GRADUACIÓN**

**Evaluación molecular de tres generaciones, G<sub>0</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, del maíz criollo pujagua rojo, utilizando 15 cebadores microsatelitales tipo SSR, CNIA-INTA, Nicaragua**

**AUTORES**

**Br. Joshua Marcell Lacayo Solórzano**

**Br. Moisés Alejandro Ponce Ruíz**

**ASESORES**

**Dr. Carlos Henry Loáisiga Caballero**

**MSc. Andrea Zamora Jarquín**

**Ing. Ricardo Javier Bolaños Pérez**

Presentado a la consideración del honorable  
tribunal examinador como requisito final para  
optar al grado de ingeniero agrónomo generalista

**Managua, Nicaragua**  
**Septiembre, 2018**



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable tribunal examinador designado por la Decanatura de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria como requisito final para optar al grado de:

**Ingeniero Agrónomo**

Miembros del tribunal examinador

---

Dr. Guillermo Reyes Castro  
Presidente

---

MSc. Isaías Sánchez Gómez  
Secretario

---

MSc. Marbell Aguilar Maradiaga  
Vocal

Managua, 18 de Septiembre del 2018

## CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo general	4
2.2. Objetivos específicos	4
III. MATERIALES Y MÉTODOS	5
3.1. Ubicación del estudio	5
3.2. Selección del material	5
3.3. Extracción del ADN	5
3.4. Amplificación de ADN	6
3.5. Electroforesis	7
3.6. Tamaño de los fragmentos	7
3.7. Análisis de los datos	9
3.7.1. Diversidad genética	9
3.7.2. Número de alelos por locus (Na)	9
3.7.3. Heterocigosidad observada (Hobs)	9
3.7.4. Heterocigosidad esperada (Hesp)	9
3.7.5. Índices de Shannon (I)	9
3.7.6. Frecuencia alélica	9
3.7.7. Contenido de información polimórfica (CIP)	10
3.8. Estructura genética	10
3.8.1. Análisis molecular de varianza	10

3.8.2. Distancia genética e Identidad genética	10
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	11
4.1. Diversidad genética.	11
4.1.1. Diversidad genética por locus	11
4.1.1.1. Numero de alelos	11
4.1.1.2. Heterocigosidad observada y esperada	11
4.1.1.3. Índice de Shannon	12
4.1.2. Diversidad genética por población	12
4.1.2.1. Número de alelos	12
4.1.2.2. Frecuencia alélica de cada locus por población	13
4.1.2.3. Heterocigosidad esperada y observada	13
4.1.2.4. Frecuencia alélica de cada locus por población	13
4.2. Análisis molecular de la varianza	18
4.3. Distancia e identidad genética	19
4.4. Patrón alélico a través de las generaciones	19
<b>V. CONCLUSIONES</b>	22
<b>VI. RECOMENDACIONES</b>	23
<b>VII. LITERATURA CITADA</b>	24
<b>VIII. ANEXOS</b>	26

## **DEDICATORIA**

A mi Dios supremo, ya que él me concedió la fuerza y la perseverancia para superar todas aquellas adversidades que se aparecieron en la culminación de este estudio.

A mi madre, Sra. Lorena Solórzano Ruíz, quien con sus posibilidades logro formar y educar a un hombre de bien. Y por demostrarme que nunca hay que darse por vencido.

A mi abuelo, Sr. Ramiro Solórzano Villalta, quien me enseñó el verdadero valor del trabajo, el amor propio y ser una persona con principios.

**Br. Joshua Marcell Lacayo Solórzano**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios primeramente, por darme la hermosa vida y el camino que ha elegido para mí.

A mi abuelita Zenobia Ruiz, quien como madre sustituta hizo un grandioso trabajo en mi formación moral y aun me sigue educando, ayer, hoy y mañana.

A mi madre Lorena Solórzano, por enseñar a ser un guerrero de luz y a su gran determinación en educarme, y mi padre Jaime Lacayo, por su apoyo y sus consejos.

A la Universidad Nacional Agraria, por ser ese espacio en el que me redescubrí y por la pasión que encontré por la agricultura y la ganadería y a sus docentes que fueron como segundos padres que prepararan profesionales y seres humanos con conciencia para poder lograr objetivos de vida.

A mis tíos Mario y Andrea, por esos buenos y malos ratos que viví a su lado, cuando me acogieron en su hogar, y por todas aquellas lecciones.

A mi primo Ramiro Montano, quién ha sido como un hermano y un ejemplo a seguir, y a mis demás primos; Ramiro Arnoldo, Manuel, Mariandrea, gracias por siempre estar ahí cuando los busqué y por los momentos inolvidables.

A mi tía Carmen, a ella quién le dicen la Doc., por tener siempre fe en mí y apoyarme en mis enfermedades y problemas, y servirme como ejemplo para llegar a ser un admirable profesional, y a mi tía Élide, quien siempre ha estado pendiente de mí, impulsándome y contribuyendo a lograr mis proyectos, y sobre todo que en algún momento su casa me sirvió como bodega.

A Michelle Navarrete, una gran oyente, consejera y amiga. Gracias por estar siempre levantándome el estado de ánimo y a mi compañero de tesis y buen amigo, Moisés Ponce quien luchó conmigo y me hizo recapacitar cuando me sentía decaído en los momentos desafortunados en el transcurso de la investigación.

Al Dr. Carlos Henry Loáisiga Caballero, quien fuese nuestro asesor, nos acompañó y escuchó nuestros problemas en esta investigación y siempre buscó como darle soluciones a nuestras inquietudes. Y que con su vasto conocimiento nos ilustró en el enfoque y culminación del estudio.

A Ing., Msc. Andrea Zamora Jarquín, por su paciencia, buena voluntad y cariño, quien nos acompañó en las etapas más duras de este trabajo en el laboratorio.

Al INTA–CNIA, por brindarnos un espacio acogedor y los equipos para poder desarrollar las etapas de la investigación y a todos sus miembros con quienes convivimos a diario durante se llevó a cabo la investigación

**Br. Joshua Marcell Lacayo Solórzano**

## **DEDICATORIA**

A Dios, por darme sabiduría, bendición y sobre todo la fortaleza espiritual necesaria para culminar uno de mis mayores logros, sin Él nada es posible.

A mi Padre, Roberto José Ponce Guzmán, por ser ese pilar fundamental que con su amor, esfuerzo, sacrificio y apoyo incondicional me dio la fortaleza necesaria para la culminación de mi carrera.

A mi madre, Carmen del Socorro Guzmán, que siempre instó y aconsejó durante toda mi vida dándome ánimos para alcanzar este objetivo.

A mi abuelo, Jorge Adalberto Ponce Cortez, por ser la persona que me inspiró elegir esta hermosa carrera.

**Br. Moisés Alejandro Ponce Ruíz**

## AGRADECIMIENTO

A Dios, que con la bendición que nos da me permitió llegar a cumplir este sueño.

A mi padre, Roberto José Ponce, que con su amor, apoyo moral y económico fue el eje principal de mi formación.

A mi mamá, Carmen del Socorro Guzmán, que siempre estuvo en desvelos en todos estos años, apoyándome y dándome ánimos para cumplir este objetivo.

A mi abuelo, Jorge Adalberto Ponce Cortez, por su amor, desvelo y apoyo que me ha dado en todo este tiempo.

A mi tía, Adriana del Carmen Ponce Guzmán, por el amor que me demuestra y esos consejos que me ha dado durante toda mi vida.

A mi tía, María Lourdes Hernández, que con su apoyo y bondad fue una persona fundamental para cumplir esta meta.

A mi amigo y colega, Joshua Marcell Lacayo, además de ser mi compañero en este estudio es la persona que me impulsó a culminar este trabajo.

A mis asesores, Dr. Carlos Henry Loáisiga, MSc. Andrea Zamora Jarquín, Ing. Ricardo Bolaños, quienes fueron mis guías, y tutores que brindaron su conocimiento para la realización de este trabajo.

A la Universidad Nacional Agraria, mi alma mater, que me formó durante estos cinco años a través de sus docentes que con entusiasmo y esmero siempre nos compartían sus conocimientos.

Al INTA-CNIA, por permitirnos desarrollar nuestra investigación en el laboratorio de agrobiotecnología, y hacer uso de sus equipos, además por el gran conocimiento adquirido de nuestra asesora MSc. Andrea Zamora Jarquín siendo ella un pilar fundamental para este estudio.

A todos ellos infinitas gracias.

**Br. Moisés Alejandro Ponce Ruíz**

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>PÁGINA</b>
1. Uso de la cámara de electroforesis (a) y el transiluminator Launch Doc-ITL (b) visualizar el desplazamiento de las bandas de ADN (c).	8
2. Frecuencia alélica del locus BNLG 1600 utilizado en las tres generaciones de maíz pujagua rojo, 2017.	14
3. Frecuencia alélica del locus NC 013 utilizado en las tres generaciones de maíz pujaguarojo, 2017.	15
4. Frecuencia alélica del locus PHI 119 utilizado en las tres generaciones de maíz pujagua rojo, 2017.	16
5. Frecuencia alélica del locus PHI 057 utilizado en las tres generaciones de maíz pujagua rojo, 2017.	17
6. Comportamiento de patrones alélicos a través de las generaciones de maíz pujagua rojo.	21

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO</b>	<b>PÁGINA</b>
1. Marcadores moleculares tipo SSR utilizados.	6
2. Parámetros de diversidad genética para marcadores micro satelitales, usado en la evaluación molecular del maíz pujagua rojo, 2017.	12
3. Análisis molecular de varianza.	18
4. Distancia e identidad genética de Nei	19

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO</b>	<b>PÁGINA</b>
1. Tabla de cebadores polimórficos utilizados en las generaciones de maíz pujagua rojo, 2017.	26
2. Abreviaturas utilizadas en la caracterización molecular de las tres generaciones de maíz pujagua rojo, 2017.	30
3. Glosario de términos genéticos de la caracterización molecular del maíz pujagua rojo, 2017.	31
4. Protocolos de los marcadores optimizados para PCR de las tres generaciones de maíz pujagua rojo, 2017.	35
5. Fotografías de la realización del estudio en las tres generaciones de maíz pujagua rojo, 2017.	40

## RESUMEN

En Nicaragua el maíz es un cultivo de mucha importancia para la seguridad alimentaria y nutricional de la población rural. El maíz es uno de los componentes en los programas de mejora genética cuyo objetivo es conocer la diversidad genética existente en el país y utilizarlos en el mejoramiento genético. Con la caracterización de las generaciones, se identificará la diversidad existente y alguna duplicidad en las generaciones. Los microsatélites se pueden utilizar para fomentar la probabilidad de identificar realmente genotipos superiores, concentrándose en probar recursos de genotipos con el mayor potencial, disminuyendo el número de la progenie que se necesita analizar para recuperar un nivel dado de ganancia, y permitiendo la mejora simultánea de características que están negativamente correlacionadas. El objetivo general fue la evaluar 3 generaciones ( $G_0$ ,  $G_2$ ,  $G_3$ ) del maíz pujagua rojo utilizando cebadores moleculares tipo microsatélites. Se utilizó la variedad criolla de maíz ( $G_0$ ) y sus correspondientes descendencias ( $G_2$  y  $G_3$ ) las cuales se obtuvieron a través del método de mejoramiento genético de selección masal. Se utilizaron 15 cebadores microsatélites tipo SSR, el estudio se realizó en el Centro Nacional de Investigación Agropecuaria (CNIA) del INTA en el año 2017. Hubo una disminución de la heterocigosidad a través de las generaciones. La heterosis esperada ( $H_e$ ) en las generaciones, en la  $G_0$  la  $H_e$  se obtuvo una media de 0.684, en la  $G_2$  disminuyó la  $H_e$  con una media de 0.594 en esta población y en la  $G_3$  la heterosis esperada fue menor que las otras generaciones teniendo una media de 0.592, se encontraron un 43 alelos raros y 25 alelos únicos y una alta variabilidad genética, en total de 123 alelos diferentes. El rango de número de alelos varió de 3 a 15. El índice de diversidad genética fue alto de 0.62, y los marcadores más informativos y polimórficos fueron el NC-013 y el BNLG-1600, con alto poder de discriminación. Los resultados mostraron que la identidad y la distancia de las generaciones no es parecida, y su comportamiento alélico es variable

**Palabras clave:** *Zea mays*, caracterización molecular, microsatélites, maíz criollo, diversidad genética.

## ABSTRACT

In Nicaragua, maize is a very important crop for the food and nutritional security of the rural population. Maize is one of the components in genetic improvement programs whose objective is to know the genetic diversity existing in the country and use them in genetic improvement. With the characterization of the generations, the existing diversity and some duplicity in the generations will be identified. Microsatellites can be used to promote the probability of actually identifying superior genotypes, focusing on testing genotype resources with the greatest potential, decreasing the number of progeny that needs to be analyzed to recover a given level of gain, and allowing the simultaneous improvement of characteristics that are negatively correlated. The general objective was to evaluate 3 generations (G0, G2, G3) of red pujagua maize using microsatellite-type molecular primers. The Creole corn variety (G0) and its corresponding descendants (G2 and G3) were used, which were obtained through the method of genetic improvement of mass selection. Fifteen SSR-type microsatellite primers were used, the study was carried out in the National Center for Agricultural Research (CNIA) of INTA in 2017. There was a decrease in heterozygosity through the generations. The expected heterosis (He) in the generations, in the G0 the He obtained an average of 0.684, in the G2 the He decreased with a mean of 0.594 in this population and in the G3 the expected heterosis was lower than the other generations having an average of 0.592, we found 43 rare alleles and 25 unique alleles and a high genetic variability, in total of 123 different alleles. The range of number of alleles varied from 3 to 15. The genetic diversity index was high of 0.62, and the most informative and polymorphic markers were NC-013 and BNLG-1600, with high discrimination power. The results showed that the identity and distance of the generations is not similar, and their allelic behavior is variable

**Key words:** Molecular characterization, microsatellites, maize, genetic diversity.

## I. INTRODUCCIÓN

En Nicaragua el maíz (*Zea Mays L.*) es un cultivo de mucha importancia para la seguridad alimentaria y nutricional de la población rural, es sembrado principalmente por pequeños agricultores de zonas favorables y también marginales para su consumo familiar, según FAO (2014), se estima que el 71.5 % de la población rural en Nicaragua viven bajo la línea de pobreza, lo que hace aún más importante al cultivo de maíz como una alternativa alimentaria, sin embargo los rendimientos son sumamente bajos 1358.5 kg/ha.

Los problemas de los bajos rendimientos se resumen al poco uso de semillas mejoradas, mal manejo del cultivo, irregularidad de las precipitaciones, uso de grano como semilla, uso de variedades de bajo potencial productivo (criollas), cultura y costumbre social, afectaciones por cambio climático, alterando la normalidad de factores bióticos y abióticos. A esto le sumamos el acceso a semillas mejorada, que por lo general no están disponibles en tiempo, ni cantidad y tienen un alto costo económico comparado con las semillas locales (FAO 2014).

Por tanto, es de interés llevar a cabo parcelas de evaluación y depuración de materiales criollos, considerando que el cultivo de maíz es de vital importancia para las familias productoras que se encuentra en zonas de pobreza e inseguridad alimentaria y que el maíz representa una fuente de ingresos y sustento alimentario promoviendo el uso de mano de obra familiar y de servicio temporal. Tomando en cuenta que el agricultor conoce y valora la agro biodiversidad de los maíces criollos de su comunidad y la zona, promoviendo de esta manera el rescate y conservación de estos materiales.

Los procesos de domesticación pueden producirse a partir de un único evento. O por el contrario, ser de eventos múltiples, repetidos tanto en el tiempo como en el espacio. En este sentido, la gran diversidad del maíz a nivel morfológico y molecular ha resultado difícil de conciliar con la pérdida de variabilidad asociada a los cuellos de botella por los que generalmente atraviesan las plantas domesticadas, llevando al surgimiento de hipótesis contrapuestas en cuanto al número de eventos de domesticación involucrados en el origen del cultivo (Tiessen, 2012).

El ADN es la molécula que contiene el código genético, siendo sus propiedades el reflejo

directo de la identidad genotípica y fenotípica de cada organismo, es muy utilizada en la identificación de especies debido a que está menos influenciada por los efectos del ambiente, y además la interpretación de los resultados es objetiva. Un fragmento de ADN que representa variación genética (polimorfismo) debido a diferencias entre individuos en la longitud o secuencia de la doble cadena en un locus en particular, se denomina marcador molecular. Los marcadores de ADN son muy estables y por lo tanto útiles en la identificación de especies y generaciones (Lewin, 2004).

Actualmente, los microsatélites son cebadores más populares en los estudios de caracterización fitogenética por su alta tasa de mutación y naturaleza codominante permiten la estimación de la diversidad genética dentro y entre familias, así como la mezcla genética entre familias incluso si están estrechamente emparentadas (Sunnucks, 2001).

Los cebadores de secuencias simples (SSR del inglés simple sequence repeats) están compuestos por repeticiones en tándem de un motivo de dos a seis pares de bases flanqueadas por regiones conservadas no repetitivas, idealmente de copia única (Bernardo *et al.*, 1996)

Los cebadores se pueden utilizar para fomentar la probabilidad de identificar realmente genotipos superiores, concentrándose en probar recursos de genotipos con el mayor potencial (i.e. con la eliminación temprana de genotipos inferiores), disminuyendo el número de la progenie que se necesita analizar para recuperar un nivel dado de ganancia, y permitiendo la mejora simultánea de características que están negativamente correlacionadas (Kahl, 1999).

La información obtenida a través del proceso de caracterización permite a toda una gama de grupos interesados, que incluye productores, gobiernos nacionales, administraciones regionales así como las instituciones mundiales, tomar decisiones informadas sobre las prioridades en la gestión de los recursos fitogenéticos (Eguiarte *et al.*, 2000 ).

El gobierno de Nicaragua a través del INTA está dedicando estudios de mejora genética en cultivos que garanticen calidad nutricional, siendo el maíz uno en los componentes en los programas de mejora genética; por tanto está trabajando en la producción de semillas de maíz en el Centro Nacional de Investigación Agropecuaria (CNIA), así como en la colecta y

caracterización de accesiones de maíz, con el objetivo de conocer la diversidad genética existente en el país y utilizarlos en programas de mejoramiento genético. Con la caracterización de las generaciones estudiados, se logrará identificar la diversidad existente y duplicidad entre ellos.

En Nicaragua, se han venido implementando estas técnicas de mejoramiento genético utilizando marcadores, como una medida para caracterizar e identificar todas las variedades y subespecies dentro de la misma especie, se pueden realizar catálogos de semillas, la consanguinidad o parentesco de las especies, y se le agrega un valor a todos los materiales criollos utilizados por los pequeños productores, para que de esta manera prevalezca su soberanía sobre el uso de sus semillas y poder llegar a certificarlas, con este estudio comprobamos a través de cebadores microsátélites tipo ssr que el método de selección masal pone en manifiesto que conforme avanzan las generaciones estas se homogenizan y muestran diferencias en su genotipo.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Evaluar molecularmente tres generaciones ( $G_0$ ,  $G_2$ ,  $G_3$ ) del maíz pujagua rojo, utilizando 15 cebadores microsátélites tipo ssr.

### **2.2. Objetivos específicos**

Caracterizar molecularmente tres generaciones de maíz pujagua rojo, utilizando 15 microsátélites.

Comparar la diversidad genética entre la población original ( $G_0$ ) y las siguientes generaciones de maíz pujagua rojo, a través parámetros genéticos estadísticos.

Identificar la cantidad de alelos raros y únicos presentes en las tres generaciones de maíz pujagua rojo.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ubicación del estudio**

El estudio se realizó en el laboratorio del centro nacional de investigación agropecuaria (CNIA-INTA), ubicado en el kilómetro 14.1 carretera norte entrada a las zonas francas privadas (ZFP) 2 kilómetros y medio al sur, en Managua.

#### **3.2. Selección del material**

La procedencia del material biológico es de la comunidad de Comalapa en Chontales, la cual se ha venido trabajando como parte de un programa de mejoramiento de parte del INTA, es un cultivar criollo, de mucha importancia para esa comunidad por sus derivados, uso del grano y uso de la semilla.

Las generaciones utilizaron los siguientes códigos; la población original actualmente utilizada en la comunidad de Comalapa en Chontales es  $G_0$ , la población de generación consecutiva es la  $G_2$  y la generación descendiente de la  $G_2$  es la  $G_3$  ambas reproducida en campos azules en condiciones controladas.

Todas estas generaciones forman parte de un programa de mejoramiento genético de parte del INTA, utilizando como método la selección masal. Una vez obtenidas las semillas de la etapa de campo fueron almacenadas en el banco de germoplasma de esta institución ( $G_0$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $G_3$ ) La  $G_1$  es la población que no se utilizó por haber sufrido contaminación al ser mezclada con otro material genético dentro del banco de germoplasma.

#### **3.3. Extracción del ADN**

De cada generación ( $G_0$ ,  $G_2$ ,  $G_3$ ) 15 semillas se germinaron en arena estéril hasta el sexto día. Se extrajeron muestras de tejido de hojas primarias con un peso total aproximado de 15mg. de cada planta germinada. Luego se desinfectaron con etanol al 70% y se secaron por 5 minutos. Se procedió a la extracción del ADN de cada hoja previamente cortada y desinfectada, se colocaron en un tubo tipo Eppendorf (1.5 ml) conteniendo 200  $\mu$ l de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl y 20 mM 2-mercaptoethanol). El tejido fue macerado utilizando pistilos plásticos hasta homogenizar las muestras. Luego, se le agregó 26  $\mu$ l de sulfato dodecil sódico al 10% y se mezcló. Las muestras se colocaron en una incubadora

tipo baño maría a 65° C por 10 minutos mezclándolo al menos tres veces en ese intervalo de tiempo.

Posteriormente se agregaron 112 µl de acetato de potasio (3M) a cada tubo y se incubó en hielo por 20 minutos. Las muestras se centrifugaron a 15,000 rpm a 5 °C por 15 minutos. Se extrajo 200 µl del sobre-nadante y se colocó en un tubo nuevo donde se agregó 0.6 volúmenes de 2-propanol helado (120 µl). Las muestras se conservaron a -20°C por 20 minutos. Luego, las muestras se centrifugaron nuevamente a 15,000 rpm a 5 °C por 15 minutos. Posteriormente, el 2-propanol se extrajo del tubo y el pellet se lavó en 100 µl de etanol (70%) tres veces centrifugado 15,000 rpm a 5 °C por 5 minutos. Seguidamente, los pellets se secaron y fueron re-disueltos en 100 µl de buffer TE (conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM EDTA) y las muestras se conservaron a -20 °C para su posterior utilización.

### 3.4. Amplificación de ADN

Se seleccionaron quince pares de cebadores microsatelitales para *Zea mays* (“Brookhaven National Laboratory of Genetics” o bnlg, “North Carolina” o nc, “Pioneer high bred” o phi y “University of Missouri-Columbia” o umc) en paréntesis se muestran los nombres de los laboratorios que producen estos microsatélites, se procuró que cada microsatelite fuera distribuido uniformemente sobre el genoma (aproximadamente 1 por cromosoma).

**Cuadro 1.** Marcadores moleculares tipo SSR utilizados en la caracterización del maíz pujagua rojo, 2017.

Locus	Secuencia (5' a 3') Forward	Secuencia (3' a 5' ) Reverse	T°C	Rango (pb)
1.BNLG 400	AGCTGTGACTGTGAAGGGAAAA	CGTCACACCGCTGTTTCTTG	51.7°	109-188
2.BNLG 197	GCGAGAAGAAAGCGAGCAGA	CGCCAAGAAGAAACACATCACA	59.5°	124-141
3.PHI 026	TAATTCCTCGCTCCCGATTTCAGC	GTGCATGAGGGAGCAGCAGGTAGTG	53°	103-145
4.PHI057	CTCATCAGTGCCGTCGTCCAT	CAGTCGCAAGAAACCGTTGCC	51.7°	127-140
5.PHI 119	GGGCTCCAGTTTTTCAGTCATTGG	ATCTTTCGTGCGGAGGAATGGTCA	52°	158-168
6.BNLG 127	CATGTATACGAGAAGCACCTAT	ATCGTAACTCAGCGGTTTGTG	49°	168-190
7.BNLG 1839	AGCAGACGGAGGAAACAAAGA	TCTCCCTCTCCCTCTTGACA	53°	175-199
8.BNLG 1176	ACTCCTCAAACCTAGGTGACA	CACCGATGATGGTGAGTACG	53°	188-238
9.UMC 1792	CATGGGACAGCAAGAGACACAG	ACCTTCATCACCTGCAACTACGAC	52.8°	128-145
10.PHI 112	TGCCCTGCAGGTTACATTGAGT	AGGAGTACGCTTGGATGCTCTTC	52.8°	51-74
11.PHI 063	GCGGCGGTGCTGGTAG	CAGCTAGCCGCTAGATATACGCT	53°	118-171
12.UMC 1464	CATGTAACCTGTGCCAAGAACACC	AAAGGAGGGTAGGAATAGCTGTGG	53°	66-91
13.BNLG 1272	ACCGAAGATGAGGTGTGACA	TCAGTGCAAGGGCAATTTAG	52°	168-183
14.BNLG 1600	CGATCAGTGCCTGGAGAGTA	TAGGCATGCATTGTCCATTG	53°	171-230
15.NC 013	AATGGTTTTGAGGATGCAGCGTGG	CCCCGTGATTCCCTTCAACTTTC	51°	86-202

Para la amplificación del ADN se utilizó una máquina PCR Eppendorf Mastercycler con gradiente termociclador. La mezcla PCR estuvo compuesta por 12.5  $\mu\text{l}$  de PCR master mix, 1  $\mu\text{l}$  de cada iniciador hacia adelante y reverso, 1  $\mu\text{l}$  de ADN de cada muestra molde proveniente de la extracción, 9.5  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas.

Para la amplificación de las muestras en la PCR se utilizó el siguiente programa: en la primera desnaturalización 3 min a 95° C, seguido por 35 y/o 40 ciclos de 30 seg 95°C en la segunda desnaturalización, 30 seg a la temperatura de alinamiento definidos para cada iniciador, 1 min 72° C en la extensión, y una etapa de extensión final de 10 min a 72° C. La reacción de amplificación se corrió en un volumen de total de 25  $\mu\text{l}$ , por muestra.

### **3.5. Electroforesis**

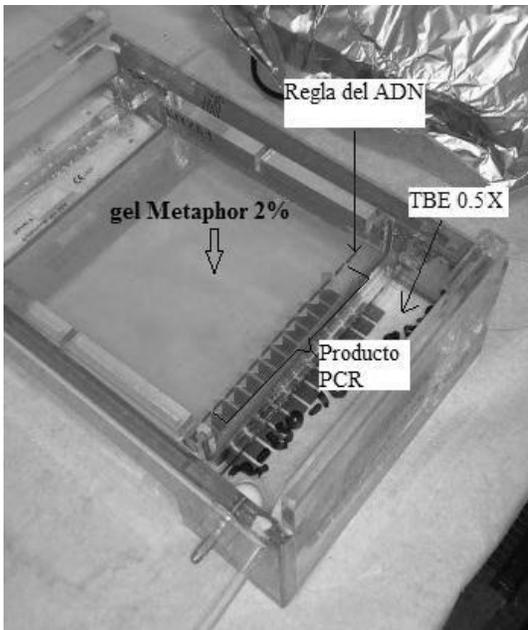
Se elaboró un gel de metaphor agarosa al 2%, diluyendo 2g de metaphor agarosa en 100 ml de TE 0.5X y 4  $\mu\text{l}$  de bromuro de etidio, se procedió a depositarlas en carcasas y se les introdujo peinetas de 20 dientes, luego se dejaron secar por 20 minutos. Obtenido el gel se sumergió en las cámaras de electroforesis conteniendo cada una 600 ml de TE 0.5X, luego se le agregó 20  $\mu\text{l}$  de producto PCR (respectivo para cada cebador) previamente mezclado ese producto con 4  $\mu\text{l}$  de 6X loading, excepto en los extremos ya que se les depositó 4  $\mu\text{L}$  de regla de ADN (ladder) con más de 100 pares de base (pb). Se corrieron las muestras a 90 voltios, 330 mAh, y 120 minutos. Todos los fragmentos de ADN productos PCR, se visualizaron y cuantificaron, al obtener la fotografía de los geles de metaphor agarosa al 2%.

El ADN en el gel, tiene cargas negativas y cuando se aplica una corriente, los fragmentos con cargas negativas son atraídos hacia la carga positiva en el otro extremo del gel. Cuanto más grande es el fragmento, más lentamente se mueve. Los pequeños fragmentos se mueven rápidamente entre las moléculas del gel, mientras que los fragmentos más grandes trabajan más difícilmente para conseguir moverse a través del gel.

### **3.6. Tamaño de los fragmentos**

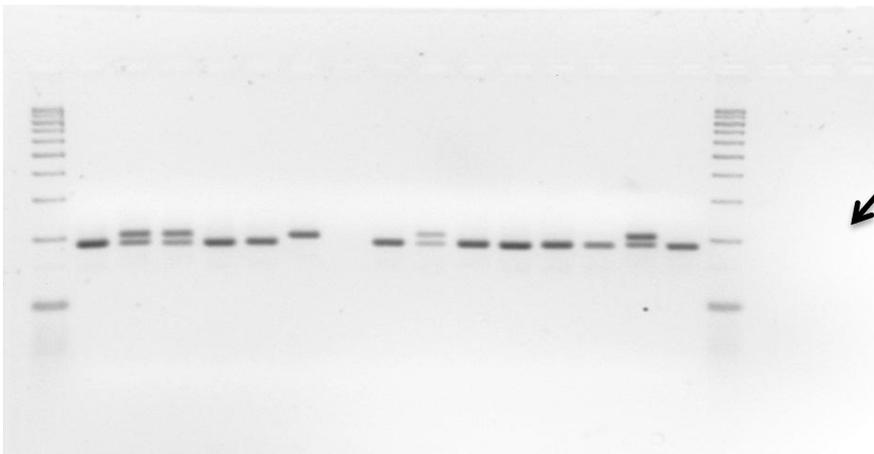
Transcurrido los 120 minutos de la electroforesis se procedió a colocar la gel en el transiluminador con cámara Canon de 12.5 mega pixeles para tomar fotografías las cuales fueron observadas con el programa lounch Doc-ITLS software de análisis de imagen, donde se identificaron las bandas de ADN. El tamaño de los fragmentos se calculó con el programa

Adobe photoshop cs6 extended, mediante cuadrículas y regla con unidad de medidas en pixeles.



a. Cámara de electroforesis

b. UPV transiluminador Launch Doc-ITL



c. Visualización del desplazamiento de bandas de ADN.

**Figura 1.** Uso de la cámara de electroforesis (a) y el transiluminador Launch Doc-ITL (b) para visualizar el desplazamiento de las bandas de ADN (c).

### **3.7. Análisis de los datos**

#### **3.7.1. Diversidad genética**

Para evaluar la diversidad genética se estimaron los parámetros siguientes: número de alelos por locus ( $N_a$ ), heterocigosidad esperada (Hesp), heterocigosidad observada (Hobs) y la frecuencia alélica ( $P_i$ ). Estos cálculos fueron obtenidos haciendo uso del programa GenAlex versión 6.2 (Peakall y Smouse, 2006).

#### **3.7.2. Número de alelos por locus ( $N_a$ )**

Constituye todas las formas alternativas que puede presentar un gen en un locus. Se determina por conteo directo de alelos diferentes para cada locus en cada grupo. Este parámetro se determinó utilizando el software de GenAlex versión 6.5 (Peakall y Smouse, 2012).

#### **3.7.3. Heterocigosidad observada (Hobs)**

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

#### **3.7.4. Heterocigosidad esperada (Hesp)**

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

#### **3.7.5. Índice de Shannon (I)**

Para el análisis de diversidad se utilizó el método índice de Shannon, el cual consiste en determinar la diversidad de especies o individuos a través de comparaciones. El índice de diversidad de Shannon es típicamente usado para medir el número de especies en una comunidad (la riqueza) y la relativa frecuencia de estas especies. El índice contempla la cantidad de especies presentes en el área de estudio, riqueza de especies, y la cantidad relativa de individuos de cada una de esas especies abundantes (Di Betetti, 2000).

El índice de Shannon se calculó para cada locus y grupos usando versión del software GenAlex ver. 6.5 (Peakall y Smouse, 2012).

#### **3.7.6. Frecuencia alélica**

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

### **3.7.7. Contenido de información polimórfica (CIP)**

Estimación de la diversidad que permite clasificar los marcadores genéticos según su nivel de polimorfismo y mide la capacidad discriminadora de los locus, en dependencia del número de alelos y la frecuencia de cada alelo en el locus marcador. Para calcular el CIP, se usó la siguiente fórmula propuesta por (Anderson *et al.*, 1993).

$$CIP = 1 - \sum (p_i^2)$$

Donde  $P_i$ : frecuencia alélica del  $i$ -ésimo alelo, en el  $j$ -ésimo el locus.

## **3.8. Estructura genética**

### **3.8.1. Análisis molecular de varianza**

Para estimar la diversidad genética se utilizó el análisis molecular de varianza, es un marco de referencia para la estimación de estructura genética a partir de la información contenida en la frecuencia alélica, y el estimador de F-estadística (FST) y a partir de ella se obtienen los componentes de covarianza asociados con posibles niveles de estructura genética, según lo descrito por Weir Cockerham (1984), utilizando el software GenAlex ver. 6.5 (Peakall y Smouse, 2012).

### **3.8.2. Distancia genética e Identidad genética**

La distancia genética es la estimación entre dos individuos que pueden ser descrita por la variación alélica (Nei, 1973). Esta determina la lejanía entre un grupo y otra basada en la frecuencia de alelos de ambos grupos.

La identidad genética ( $D_i$ ) y la distancia genética ( $D$ ) se obtuvieron según Nei (1978), mediante el software GenAlex version. 6.5 (Peakall y Smouse, 2012).

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. Diversidad genética**

#### **4.1.1. Diversidad genética por locus**

##### **4.1.1.1. Número de alelos**

Se encontraron un total de 123 alelos en 15 cebadores utilizados que mostraron ser polimórficos ya que según lo descrito por Tiessen (2012), para que un cebador sea polimórfico debe tener como mínimo 2 variantes o alelos para que genere una información útil; el número de alelos amplificados por locus presentó valores comprendidos entre 3-16, con un promedio de 8 alelos por locus. El PHI 119 y el PHI 057 identificaron el menor número de alelos con 3 y 5 alelos respectivamente, los cebadores NC 013 y el BNLG 1600 presentaron un mayor número de alelos con 15 alelos cada uno.

Los cebadores utilizados para la amplificación produjeron fragmentos con rangos de pares de bases entre 51 a 238, PHI 112 identificó los fragmentos comprendido entre 51-73 pb y el BNLG 1176 identificó el de mayor rango entre 188-238 pb (Cuadro 2).

##### **4.1.1.2. Heterocigosidad observada y esperada**

La estimación de heterocigosidad para las diferentes generaciones analizadas por locus, presentaron baja Hobs, con valor promedio de 0.19, variando entre 0.001 a 0.552. El maíz por naturaleza es heterocigoto y la forma de reproducción y el método de mejoramiento influyen los niveles de heterocigosidad. Es decir que al ser una planta alógama las características genéticas son variables en cada una de las plantas de maíz pujagua rojo. Al someterlo a selección masal estas características mantienen la heterocigosidad observada en estos niveles, aunque algunas veces es probable que en la determinación del genotipo, el ADN sea no codificante por lo tanto no se encontrarían valores de heterocigosidad observada. La Hesp fue alta con valor promedio de 0.62 cuyo valor representa que los niveles de heterocigosidad son altos porque es una planta de reproducción sexual cruzada, lo que genera alta diversidad genética (Cuadro 2).

#### 4.1.1.3. Índice de Shannon

El índice de diversidad de Shannon mostró media de 1.25, el menor valor fue expresado por el marcador PHI 119 con rango de 0.08 y el mayor valor lo presentó el marcador PHI 026 con 1.92 (Cuadro 2), esto indicó la diversidad genética de individuos presentes en el estudio. Los marcadores BNLG 1600 con 1.79 y NC 013 con 1.78 presentaron valores altos de efectividad y mayor diversidad de individuos en el locus.

**Cuadro 2:** Parámetros de diversidad genética generados por los 15 marcadores micro satelitales, usados en la evaluación molecular del maíz pujagua rojo, 2017.

<i>Locus</i>	<i>Rango (pb)</i>	<i>Na</i>	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>H<sub>esp</sub></i>	<i>PIC</i>	<i>I</i>
BNLG 400	109-188	8	0.04	0.50	0.58	1.021
BNLG 1600	171-230	15	0.33	0.78	0.80	1.790
NC 013	86-202	15	0.55	0.79	0.79	1.785
PHI 119	158-168	3	0.01	0.04	0.31	0.082
BNLG 1179	188-238	9	0.26	0.65	0.67	1.337
BNLG 1839	175-199	7	0.35	0.68	0.69	1.310
PHI 026	103-145	11	0.48	0.82	0.83	1.923
UMC 1792	128-145	7	0.01	0.61	0.64	1.175
PHI 057	127-140	5	0.01	0.67	0.62	1.210
PHI 112	51-74	8	0.01	0.72	0.75	1.424
PHI 063	118-171	9	0.12	0.67	0.71	1.278
UMC 1464	66-91	7	0.22	0.67	0.69	1.275
BNLG 197	124-141	7	0.29	0.68	0.66	1.297
BNLG 127	168-190	6	0.02	0.33	0.30	0.607
BNLG 1272	168-183	6	0.14	0.68	0.67	1.312
<b>Media</b>	129-167	8	0.19	0.62	0.64	1.254

Número de alelos (N), Heterocigosidad observada ( $H_{obs}$ ), Heterocigosidad esperada ( $H_{esp}$ ), Contenido de información polimórfica (PIC), Índice de Shannon (I).

#### 4.1.2. Diversidad genética por población

##### 4.1.2.1. Número de alelos

Los índices de diversidad genética en los cebadores estudiados en cada una de las tres generaciones obtuvieron un número de alelos comprendido desde 4.46 hasta 5.40. La población original obtuvo el mayor número de alelos de 5.40 seguido de la  $G_2$  con 5.00, y por último la población  $G_3$  con 4.46 alelos, las generaciones tuvieron una muestra media de 15 individuos (Anexo 1). Esta información concuerda, debido a que en teoría la población original es más heterocigótica, en relación a las generaciones que se originan de ella.

#### **4.1.2.2. Frecuencia alélica de cada locus por población**

Los cebadores NC 013, y BNLG 1600 identificaron un total de 15 alelos, seguido por los cebadores BNLG 1176 y PHI 026 con 9 y 11 alelos respectivamente. La población que mostro mayor frecuencia alélica ( $N_a$ ) fue la  $G_0$ , en segundo lugar, la  $G_2$ , seguido de la población  $G_3$ . (Anexo 1).

#### **4.1.2.3. Heterocigosidad esperada y observada**

La heterocigosidad observada presentó una media de 0.197, esta reflejó una variación de 0.001 a 0.667, por otro lugar la heterocigosidad esperada obtuvo una variación de 0.001 a 0.856, con media de 0.624, es decir que la heterocigosidad se mantiene debido a que la heterosis es un fenómeno común en este cultivo al ser una planta de polinización cruzada, (Zaldivar y Rocha, 2006). La heterocigosidad esperada fue alta y es considerada alta cuando expresa valores mayores a 0.5, es decir que aumenta cuando se acerca a 1, y disminuye cuando se acerca a 0; por tanto, cuando se encuentran valores mayores a 0.5 se dice que existe alta diversidad genética. El mayor índice de heterocigosidad observada lo expresó población  $G_0$  con 0.684, en segundo lugar, la  $G_3$  con 0.594, y de último lugar la  $G_2$  con 0.592 (Cuadro 2)

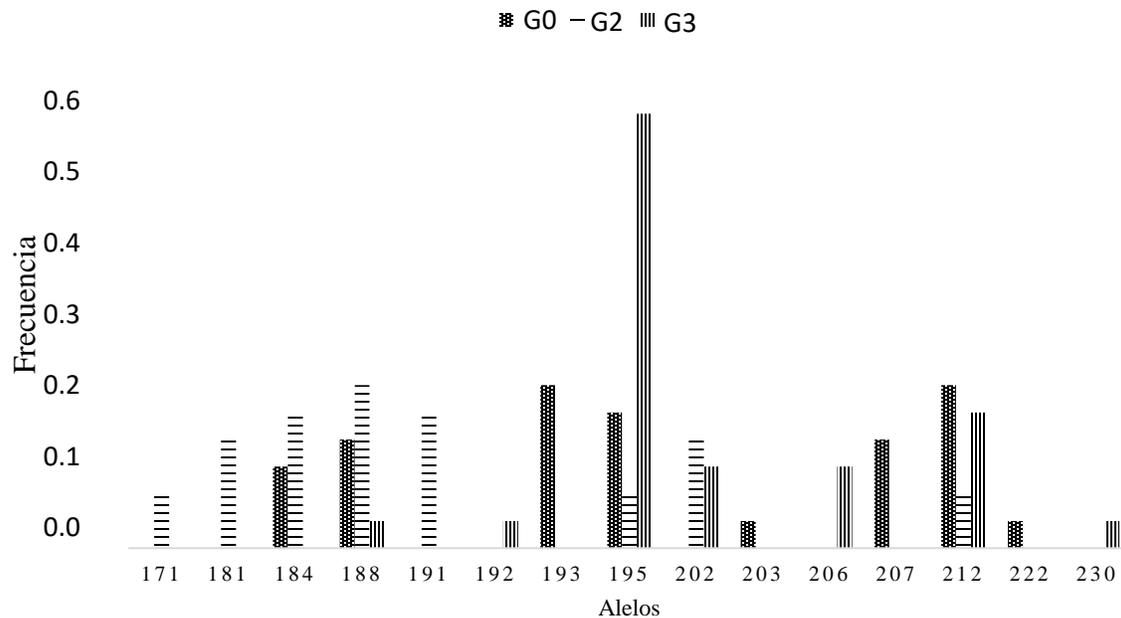
#### **4.1.2.4. Frecuencia alélica de cada locus por población**

Entre los mejores cebadores se encuentran el cebador BNLG 1600 identificó 15 alelos diferentes, seguido por el NC 013 con 15 alelos. La población que mostro mayor frecuencia alélica ( $N_a$ ) fue la  $G_0$  (5.4), en segundo lugar la  $G_2$  (5.0), seguido de la población  $G_3$  (4.467) (Anexo 1).

La probabilidad de pertenencia de un individuo de origen desconocido a una población determinada estará dada por la probabilidad de encontrar en ella un individuo con igual genotipo multilocus. Asumiendo independencia entre loci y ajuste a las proporciones de Hardy-Weinberg, esta probabilidad no es más que el producto de las frecuencias genotípicas esperadas para cada locus (Paetkau *et al*, 1995).

En la Figura 2 se observa una alta presencia de alelos en el locus, siendo los alelos 195, 212 y 188 los únicos en presentar frecuencias en las tres generaciones, siendo más dominante la  $G_3$ , y la  $G_2$  también se manifestó con mayor frecuencia el alelo 171, 181, 184, 191; la menor

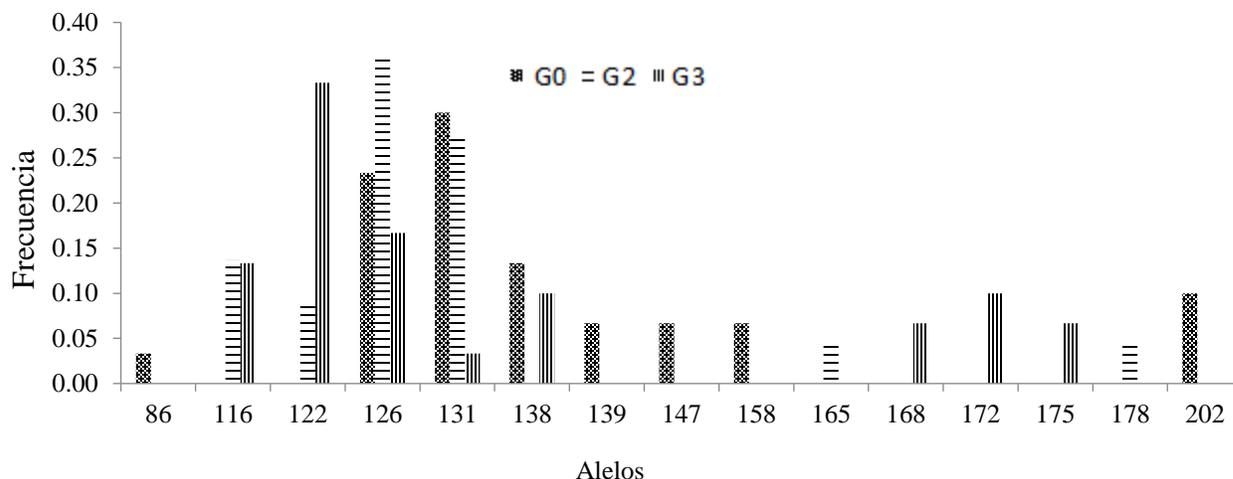
frecuencia alélica de la G<sub>0</sub> fueron los alelos 184, 203 y 222 con el mismo valor en todos ellos, siendo en esta única población en presentarse dichos alelos; por último el alelo con mayor frecuencia en la G<sub>3</sub> fue el 195, en esta misma población se observó la menor frecuencia alélica de todo el locus en los alelos 192, 207, y 230 siendo dominantes únicamente en esta población.



**Figura 2.** Frecuencia alélica del locus BNLG 1600 utilizado en las tres generaciones de maíz pujagua rojo, 2017.

La teoría de dominancia es la más aceptada explicación del fenómeno de heterosis. Dos parentales portadores de diferentes alelos dominantes al ser cruzados producen una G<sub>1</sub> más vigorosa que cada parental individualmente (Johnson y Hutchinson, 1993).

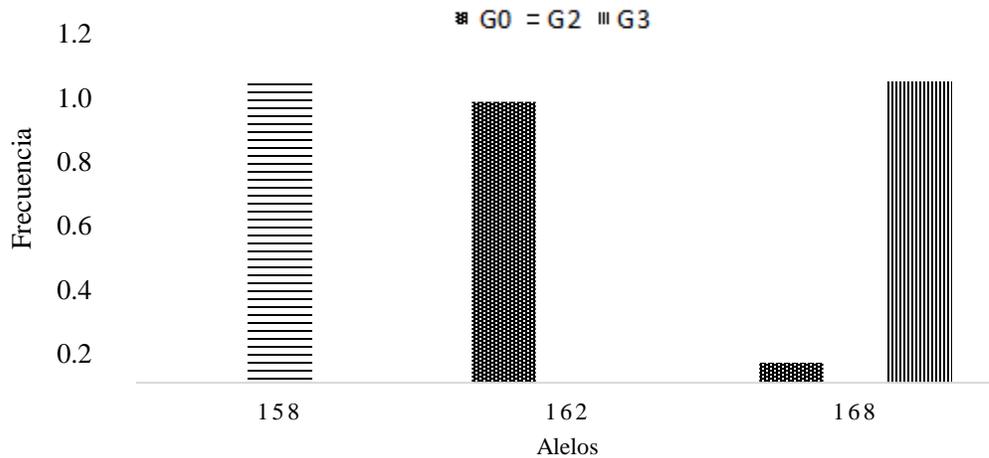
El locus NC 013 muestra una frecuencia de 15 alelos diferentes, los alelos que mantuvieron frecuente en las tres generaciones son 126 y 131, mostrando mayor frecuencia en G<sub>2</sub> y G<sub>0</sub>, indicando que tiene mayor dominancia para el carácter de este alelo. Los 15 alelos presentes en el marcador NC 013, son pocos frecuentes en las generaciones, los alelos 116 y 122 en las generaciones G<sub>2</sub> y G<sub>3</sub> coinciden con este alelo. Con menor frecuencia fue 138, ya que está presente en dos generaciones G<sub>0</sub> y G<sub>3</sub>, estas son dominantes para este carácter (Figura 3).



**Figura 3.** Frecuencia alélica del locus NC 013 utilizado en las tres generaciones de maíz pujagua rojo, 2017.

La deriva genética es un caso particular de los errores de muestreo. La magnitud de los errores de muestreo es inversamente proporcional al tamaño de la muestra: cuanto menor es la muestra mayores son sus efectos. En el caso de los organismos vegetales, cuanto menor es el número de polen en una población, probablemente mayores serán los cambios en las frecuencias alélicas debidos a la deriva genética (Tiessen, 2012).

Entre los locus menos polimórficos se encuentran el PHI 119 y PHI 057. El locus PHI 119 (Figura 4) se observa que hay presencia de tres alelos diferentes y el alelo con mayor frecuencia en este locus, es el 168, presentándose en las la  $G_0$  y la  $G_3$  siendo el carácter de este alelo dominante en la población  $G_3$ ; el alelo que presentó menor frecuencia fue el 162 únicamente presente en la  $G_0$ . La mayor frecuencia alélica en la  $G_2$  fue en el alelo 158.

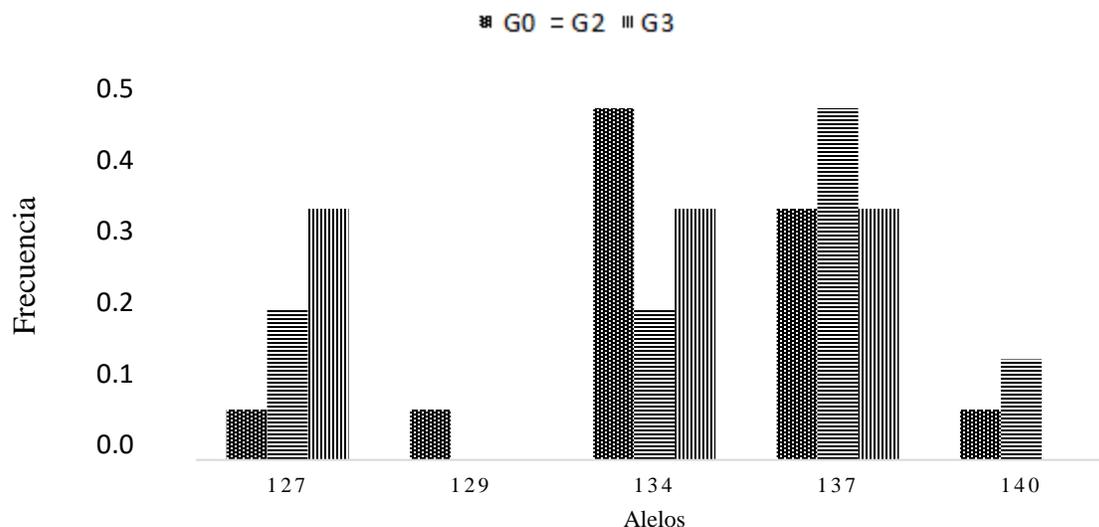


**Figura 4.** Frecuencia alélica del locus PHI 119 utilizado en las tres generaciones de maíz pujagua rojo, 2017.

(Wright, 1951) propuso que en determinadas circunstancias, la deriva genética causada por pequeños censos efectivos de población puede dar lugar a cambios notables en las frecuencias alélicas. A menos que una población sea muy pequeña, los cambios en las frecuencias alélicas debidos a la deriva serán pequeños de una generación a otra, pero los efectos a lo largo de muchas generaciones pueden ser grandes.

La aparente dominancia de alelos recesivos (pseudodominancia) es también indicativo de la existencia de deleciones ya que la falta del segmento correspondiente, “desenmascara” alelos recesivos presentes en el homólogo normal que, inesperadamente, se ponen de manifiesto (Tiessen, 2012).

En la siguiente Figura, el locus PHI 057 se muestra que presentó 5 alelos diferentes, manifestándose en tres alelos relevantes 127, 134 y 137, ya que en ellos están frecuentes en las tres generaciones, con mayor frecuencia  $G_3$  para el alelo 127,  $G_0$  para el alelo 134 y el alelo 137 domino en el  $G_2$ . Únicamente la población  $G_0$  se presentó en el 129. Además el alelo 140 estuvo presente en las generaciones  $G_0$  y  $G_2$  siendo más dominante para la  $G_2$  este carácter específico.



**Figura 5.** Frecuencia alélica del locus PHI 057 utilizado en las tres generaciones de maíz pujagua rojo, 2017.

Entre las generaciones adyacentes de una especie el flujo de genes puede ser grande, por lo que es de esperar que las generaciones contiguas posean una composición génica más semejante que las que están más alejada geográficamente (Tiessen, 2012).

Tiessen (2012) señala, para que un cebador sea polimórfico debe tener como mínimo 2 variantes o alelos para que genere una información útil, en este caso los cebadores mostraron una media de 8 alelos por cada uno de ellos, en Anexo 1 se puede apreciar la información generadas por los cebadores, respecto a la cantidad de alelo por locus y la frecuencia de alelos dentro de las generaciones.

El comportamiento y movimiento de los alelos únicos y raros, se debe a la segregación de genes y homogenización del cultivo gracias a la selección masal a la que fue sometido el maíz pujagua, por tanto se puede observar diferenciación en los datos de las generaciones (G<sub>0</sub>, G<sub>2</sub> y G<sub>3</sub>) y los numero de alelos por cada locus (Anexo 1).

Todos los datos generados por el Anexo 1 también comprueban que las generaciones del maíz pujagua rojo son diferentes entre sí y que este cultivo se va homogenizando paulatinamente, por lo cual el método de mejoramiento selección masal está funcionando y cumpliendo con el objetivo planteado.

## 4.2. Análisis molecular de la varianza

Se registraron estadísticas entre y dentro de las generaciones (Cuadro 3). Según los datos generados por los 15 microsatélites analizados, se han detectado dentro de las generaciones un total variación de 79% y entre las generaciones 21%. La mayor diferencia existe dentro de las generaciones, esto se debe en principio a que el cultivo es de naturaleza heterogénea al ser una planta de polinización cruzada. Sin embargo, la causa de mayor peso se debe a la diferenciación que se ha formado entre las generaciones, producto de los cruces controlados, que se realizaron en las sucesivas generaciones, para tratar de alcanzar la homogenización de los caracteres de interés, sin restarle que como consecuencia de ser una especie alógama mantengan la segregación de otros caracteres y por tanto la heterocigosidad.

Entre población la variación genética se debe al método de selección masal, ya que con este método se pretendió homogenizar el cultivo a partir de la G<sub>0</sub> hasta la G<sub>3</sub>, según los datos obtenidos, la gradiente de heterosis se va reduciendo conforme avanzan las generaciones haciéndolas diferentes entre sí.

Estos resultados presentaron valores significativos ya que el valor de p entre población y dentro de población es mayor al valor de significancia (0.05), con este resultado se concluye estadísticamente que existe variación genética significativa dentro y entre población (Cuadro 3).

Los resultados de varianza molecular se asemejan con otros estudios realizados. Rojas (2015), evaluó la diversidad genética de maíz criollo e indígena en Colombia, encontrando gran parte de la diferencia genética dentro de las ´generaciones con un 88% y solo el 12% se encontró entre ellas

**Cuadro 3:** Análisis molecular de varianza de las tres generaciones de maíz pujagua rojo, 2017.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Var. Est.</b>	<b>% Var.</b>	<b>Valor p</b>
<b>Entre generación</b>	2	88.822	44.411	1.315	21%	0.0013
<b>Dentro de generación</b>	87	431.300	4.957	4.957	79%	<0.0001
<b>Total</b>	89	520.122		6.273	100%	

### 4.3. Distancia e identidad genética

La matriz de distancia es siempre una matriz simétrica y cuadrada. En la diagonal la matriz presentó elementos iguales a cero, esto se debe a que ellos representan la distancia de una población consigo misma. El Cuadro 4 muestran los datos para distancias e identidad genética entre las generaciones evaluadas ( $G_0$ ,  $G_2$ ,  $G_3$ ) con el estimador genético de Nei (Nei, 1978).

La población original ( $G_0$ ) y la  $G_2$  se encuentran a una distancia de 0.67, siendo esta la menor distancia entre todos los pares de generaciones. Estas generaciones tienen una similitud multivariada (a través de todos los loci), pero de la  $G_0$ , a la  $G_3$  se obtuvo una mayor distancia (0.83), esto se debe al proceso de mejoramiento de selección masal, en teoría este proceso debe de homogenizar las generaciones descendientes de la  $G_0$ .

**Cuadro 4:** Distancia e identidad genética de Nei presentes en las tres generaciones de maíz pujagua rojo, 2017.

	Identidad		
	$G_0$	$G_2$	$G_3$
Distancia	$G_0$ 0,00	0,67	0,83
	$G_2$ 0,67	0,00	0,81
	$G_3$ 0,83	0,81	0,00

### 4.4. Patrón alélico a través de las generaciones

Dos datos estadísticos comúnmente utilizados para estimar la variabilidad en generaciones naturales, son el número promedio de alelos y la heterocigosis esperada promedio, estos permiten comparar la diversidad genética entre taxones (Doebly y Goodman, 1984).

(Pressoir y Berthaud, 2004) describieron los niveles de diversidad genética en generaciones locales de razas nativas de maíces blancos del Valle de Oaxaca, México. De acuerdo con lo esperado para generaciones correspondientes a las áreas centrales de la distribución, los valores de heterocigosis esperada ( $H_e$ : 0,65-0,72) fueron levemente superiores a lo encontrado en el presente estudio.

Aspectos relevantes que surgen de la comparación de los patrones de variabilidad, particularmente en el caso de plantas con importancia económica, es cuantificar la diversidad contenida en los materiales autóctonos y determinar qué porcentaje de esta última se halla representado en las variedades comerciales. Como ejemplo puede mencionarse lo encontrado por Goodman y Stuber (1983) para las razas de maíz en Bolivia: una muestra de 50 plantas de cualquiera de las razas bolivianas posee el mismo número de alelos isoenzimáticos que todo el conjunto de líneas endocriadas (inbred lines) más utilizadas en los Estados Unidos.

Los resultados encontrados manifiestan cierta heterogeneidad en el comportamiento de los loci, aún en generaciones con un patrón general de ajuste a las proporciones de equilibrio. Esto puede deberse a errores de muestreo, fallas experimentales, errores de tipificación, o bien, a la existencia de alelos nulos.

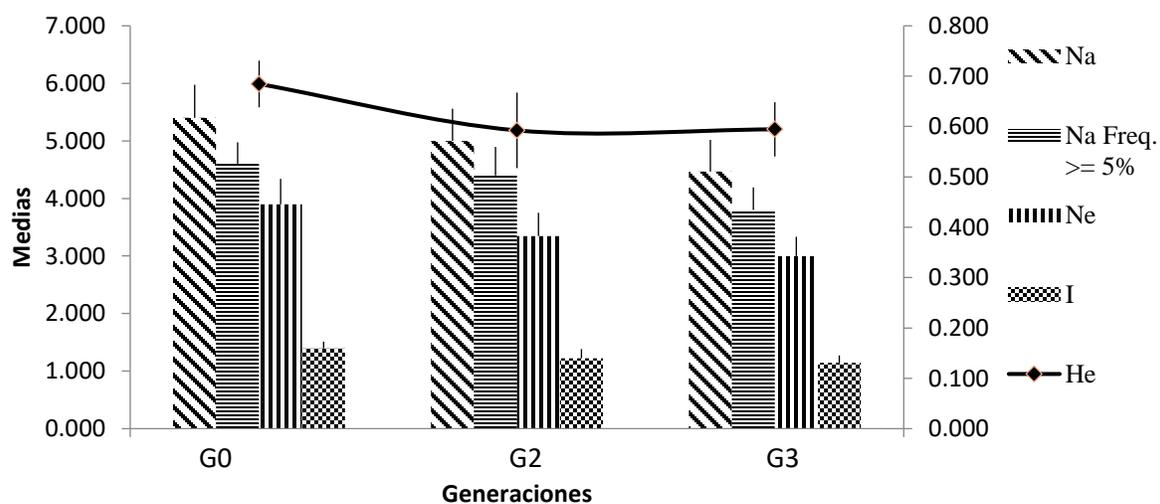
La heterogeneidad observada también puede explicarse sin tener que recurrir a errores de manejo del polen paterno. En presencia de bajos niveles de cruzamientos entre familias, aquellos marcadores con mayor número de alelos o polimórficos, una población es panmixica cuando todos los individuos presentan tantas probabilidades de reproducirse con los otros que no importa cualquier individuo, y se dan estos cruces de forma natural en vida silvestre.

En la Figura 6 se observa los patrones alélicos de la  $G_0$ ,  $G_2$  y  $G_3$ , en la cual se apreció una disminución de la heterocigosidad a través de las generaciones, prueba de ello es la heterosis esperada ( $H_e$ ) en las generaciones, en la cual la  $G_0$  la  $H_e$  se obtuvo una media de 0.684, en la  $G_2$  disminuyó la  $H_e$  con una media de 0.594 en esta población y en la  $G_3$  la heterosis esperada fue menor que las otras generaciones teniendo una media de 0.592, esta disminución también se apreció en los otros parámetros estadístico, como el índice de Shannon ( $I$ ), número de alelos efectivos ( $N_e$ ), número de alelos diferentes ( $N_a$ ) y el número de alelos diferentes con una frecuencia del 5% ( $N_a \text{ freq.} \geq 5\%$ ).

Esta disminución de la variabilidad genética se debe probablemente al método de mejoramiento genético utilizado inicialmente para la obtención de las generaciones ( $G_0$ ,  $G_2$ ,  $G_3$ ), lo cual quiere decir que este proceso de mejoramiento está funcionando en esa dirección, logrando homogenizar un poco esta variabilidad desde la población original ( $G_0$ ), hasta la descendencia, en este momento la generación tres ( $G_3$ ).

De igual manera el comportamiento de la Figura 6, es congruente con el contenido o movimiento de los alelos raros y únicos a través de las generaciones. Este estudio proporcionó efectivamente la homogenización en la muestras ya que se encontró en las generaciones una disminución en sus alelos raros desde la G<sub>0</sub> hasta la población meta G<sub>3</sub>, la G<sub>0</sub> 16 alelos raros, la G<sub>2</sub> presentó 17 alelos raros y G<sub>3</sub> 10 alelos raros. Además se encontró una disminución en sus alelos únicos para cada población, la G<sub>0</sub> con 9 alelos únicos, la G<sub>2</sub> con 7 y por último la G<sub>3</sub> con 9 alelos únicos (Anexo 1).

Sin embargo, estos resultados tienen dos diferentes connotaciones: a) al haber una disminución de alelos raros y únicos se están eliminando paulatinamente caracteres no deseados en la estructura genética de la generación meta (G<sub>3</sub>), o b) que sea lo contrario, que se elimine paulatinamente genes o caracteres de interés en la generación meta (G<sub>3</sub>).



**Figura 6.** Comportamiento de patrones alélicos a través de las generaciones de maíz pujagua rojo.

Índice de Shannon (I), número de alelos efectivos (Ne), número de alelos diferentes (Na) y el número de alelos diferentes con una frecuencia del 5% ( Na freq.>=5%).

## V. CONCLUSIONES

La evaluación molecular en las tres generaciones de maíz pujagua rojo, a través de los quince cebadores mostró diferencias entre las generaciones en las frecuencias alélicas de cada una de ellas.

La mayor diversidad genética se encontró dentro de las generaciones, dado que la identidad genética entre ellas, confirmo la mayor distancia entre la  $G_0$  y  $G_3$  y la mayor similitud entre la población  $G_0$  y  $G_2$ . Los cebadores microsatelitales SSR demostraron eficiencia en la detección de la variabilidad genética entre las generaciones, en general para la población  $G_3$  se detectó que tiene una baja ( $H_e$ ) con respecto a las demás generaciones, de igual manera ocurrió en los demás parámetros de diversidad genética como el  $N_a$ , la  $H_o$  y las frecuencia alélicas.

El contenido de los alelos raros (43) y únicos (25) disminuyó conforme avanzan las generaciones, identificando los microsatélites NC 013, BNLG 1600 como marcadores polimórficos.

## **VI. RECOMENDACIONES**

Realizar estudios de mejora genética en el maíz criollo, ya que el 85% de la semilla que se usa en la producción sigue siendo criolla, además de ser un punto de partida de variedades mejoradas.

Los marcadores NC 013, BNLG 1600 y el PHI-026 se pueden utilizar en futuras investigaciones de diversidad genética, ya que mostraron mejores resultados en cuanto a los datos polimorfismo.

Proporcionar a los estudiantes información acerca de mejoramiento genético y prácticas de caracterización molecular, para que el desarrollo del mejoramiento genético en Nicaragua sea más eficiente.

## VII. LITERATURA CITADA

- Anderson, J. Churchill, G. Autrique, J. Tanksley S. Sorrells, M. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* (36), 181–186.
- Bernardo R. Murigneux A. Karaman Z., 1996. Marker-based estimates of identity by descent and likeness in state among maize inbreds. *Theor Appl Genet* (93), 262-267.
- Casalla, R. 2003. *Medición de la distancia genética en grupos de camarón blanco Liptopenaeus Vannamei en la costa ecuatoriana*. (Tesis de maestría). Escuela Superior Politécnica del litoral, Guayaquil.
- Di Betetti, M. 2000. The distribution of grooming among female primates: testing hypotheses with Shannon-Wiener diversity index. *Behaviour* 137 (11), 1517-1540.
- Doebley, J. Goodman, M. 1984. Isoenzymatic variation in *Zea* (Gramineae). *Systematic Botany* (9) 203-218
- Eguiarte, L. Silva, A. Souza, V. 2000. Biología evolutiva de la familia Agavaceae: biología reproductiva, genética de generaciones y filogenia. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. (166), 131-150.
- FAO. 2014. *Perspectivas de cosechas y situación alimentaria*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i3899s.pdf>.
- Goodman, M. y Stuber W. 1983. Isozyme variation among races of maize in Bolivia. *Raizes of maize* (28), 169-187.
- Johnson T.E. Hutchinson E.W. 1993. Absence of strong heterosis for life span and other life history traits in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. (134). 465-474.
- Kahl W. 1999. Characterisation and mapping of sequence-tagged microsatellite sites in the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome. *Mol Gen Genet* (262), 90–101.
- Lewin, B. 2004. Chromosomes consist of nucleosome. *Genes* (8), 747-844.

- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc natl acad scin USA*. (70), 3321-3323.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetic* (83), 583-590.
- Paetkau, D. Calvert W. Stirling, I. Strobeck, C., 1995 Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* (4), 347-354.
- Peakall, R. Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6.2: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology* (6), 288-295.
- Peakall, R. Smouse, P.E., 2012. GENALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology* (6), 288-295.
- Pressoir, G. Berthaud, J. 2004. Patterns of population structure in maize Landraces from the Central Valleys of Oaxaca in Mexico. *Heredity* (92), 88-94.
- Rojas, R. 2015. Evaluación de la diversidad genética en las razas criollas e indígenas de maíz en Colombia mediante marcadores moleculares tipo RAMs. Universidad nacional de Colombia, Colombia. 93p.
- Sunnucks, P. 2001. The Impact of the habitat fragmentation on dispersal of cunningham's skink (*Egernia Cunnighami* evidence from allelic and genotypic analyses of microsatellites. *Molecular ecology*. (4), 867-878.
- Tiessen, A. 2012. Fundamento de mejoramiento genético vegetal. Madrid, España: Editorial académica española.
- Weir, B. Cockerham, C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. (38), 1358-1370.
- Wright s. 1951. The genetic structure of population. *Annals of eugenics* (15), 323-354.
- Zaldivar, M. Rocha, O. 2006. *Diversidad genética y variación en la viabilidad de plantas cultivadas en sistemas agrícolas*. (Tesis de Pregrado). Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

## VIII. ANEXOS

**Anexo 1** Tabla de cebadores polimórficos utilizados en las generaciones de maíz pujagua rojo, 2017.

<b>Cebadores</b>	<b>Alelos</b>	<b>P<sub>0</sub></b>	<b>CV<sub>2</sub></b>	<b>CV<sub>3</sub></b>
<b>BNLG 400</b>	<b>N</b>	14	15	14
A	<b>109</b>		1.000	0.107
B	<b>112</b>	0.429		0.214
C	<b>115</b>	0.214		0.214
D	<b>118</b>	0.143		0.250
E	<b>120</b>	0.214		
F	<b>122</b>			0.143
G	<b>125</b>			0.036
H	<b>188</b>			0.036
<b>BNLG 1600</b>	<b>N</b>	15	15	15
A	<b>171</b>		0.067	
B	<b>181</b>		0.133	
C	<b>184</b>	0.100	0.167	
D	<b>188</b>	0.133	0.200	0.033
E	<b>191</b>		0.167	
F	<b>192</b>			0.033
G	<b>193</b>	0.200		
H	<b>195</b>	0.167	0.067	0.533
I	<b>202</b>		0.133	0.100
J	<b>203</b>	0.033		
K	<b>206</b>			0.100
L	<b>207</b>	0.133		
M	<b>212</b>	0.200	0.067	0.167
N	<b>222</b>	0.033		
O	<b>230</b>			0.033
<b>NC 013</b>	<b>N</b>	15	11	15
A	<b>86</b>	0.033		
B	<b>116</b>		0.136	0.133
C	<b>122</b>		0.091	0.333
D	<b>126</b>	0.233	0.364	0.167
E	<b>131</b>	0.300	0.273	0.033
F	<b>138</b>	0.133		0.100
G	<b>139</b>	0.067		
H	<b>147</b>	0.067		
I	<b>158</b>	0.067		

J	165		0.045	
K	168			0.067
L	172			0.100
M	175			0.067
N	178		0.045	
O	202	0.100		
<b>PHI 119</b>	<b>N</b>	15	15	15
A	158		1.000	
B	162	0.933		
C	168	0.067		1.000
<b>BNLG 1176</b>	<b>N</b>	14	14	13
A	188	0.214	0.071	
B	191	0.393	0.321	
C	196	0.143	0.393	0.692
D	202	0.179		
E	210	0.036	0.036	0.077
F	216		0.107	0.038
G	220		0.071	
H	233	0.036		0.115
I	238			0.077
<b>BNLG 1839</b>	<b>N</b>	12	15	15
A	175		0.100	
B	180	0.417		
C	183	0.167	0.433	0.200
D	185	0.042	0.133	0.567
E	191	0.167	0.200	
F	194	0.208	0.100	0.233
G	199		0.033	
<b>PHI 026</b>	<b>N</b>	15	15	15
A	103	0.033	0.067	0.033
B	109	0.100	0.167	0.067
C	112	0.167	0.267	0.100
D	117	0.033	0.233	0.133
E	120	0.200		0.167
F	125	0.133	0.067	0.367
G	128	0.067		0.033
H	132	0.033		
I	135	0.033	0.167	
J	138	0.067		0.100
K	145	0.133	0.033	
<b>UMC 1792</b>	<b>N</b>	15	15	15

A	128	0.133		
B	130	0.133	0.067	
C	133	0.533	0.200	
D	136	0.200	0.067	0.200
E	140		0.533	0.600
F	142		0.067	0.200
G	145		0.067	
<b>PHI 057</b>	<b>N</b>	15	15	15
A	127	0.067	0.200	0.333
B	129	0.067		
C	134	0.467	0.200	0.333
D	137	0.333	0.467	0.333
E	140	0.067	0.133	
<b>PHI 112</b>	<b>N</b>	14	14	14
A	51		0.143	
B	55	0.071	0.429	
C	60	0.143		0.214
D	63	0.286	0.071	
E	66			0.429
F	68	0.071	0.214	
G	70	0.214	0.071	0.357
H	74	0.214	0.071	
<b>PHI 063</b>	<b>N</b>	13	13	15
A	118		0.115	
B	125	0.308	0.231	
C	130	0.231	0.231	
D	134	0.308	0.346	
E	137	0.077	0.038	
F	145	0.077	0.038	
G	161			0.567
H	166			0.400
I	171			0.033
<b>UMC 1464</b>	<b>N</b>	15	15	14
A	66		0.167	
B	70	0.233	0.267	
C	75	0.333	0.500	0.107
D	80	0.133	0.067	0.536
E	85	0.200		
F	87	0.100		0.286
G	91			0.071
<b>BNLG 197</b>	<b>N</b>	15	15	14

A	<b>124</b>		0.067	0.071
B	<b>128</b>			0.071
C	<b>132</b>		0.100	0.179
D	<b>135</b>	0.433	0.067	0.286
E	<b>136</b>		0.033	
F	<b>138</b>	0.200	0.433	
G	<b>141</b>	0.367	0.300	0.393
<b>BNLG 127</b>	<b>N</b>	15	14	15
A	<b>168</b>	0.067		
B	<b>173</b>	0.633	0.929	0.800
C	<b>175</b>			0.067
D	<b>176</b>	0.267		0.133
E	<b>183</b>		0.071	
F	<b>190</b>	0.033		
<b>BNLG 1272</b>	<b>N</b>	15	15	15
A	<b>168</b>		0.067	0.133
B	<b>172</b>	0.200	0.167	
C	<b>174</b>	0.500	0.467	0.333
D	<b>177</b>	0.033	0.067	0.400
E	<b>180</b>	0.167	0.233	
F	<b>183</b>	0.100		0.133
<b>Media</b>	<b>147</b>			

<b>Alelos Raros</b>	16	17	10	43
<b>Alelos únicos</b>	9	7	9	25
<b>Total</b>	25	24	19	

**Anexo 2:** Abreviaturas utilizadas en la caracterización molecular de las tres generaciones de maíz pujagua rojo, 2017

<b>Siglas</b>	<b>Significado</b>
ADN	Acido desoxirribonucleico
AMOVA	Análisis Molecular de Varianza
CNIAB	Centro Nacional de Investigación Agropecuaria y Biotecnología
CIA	Cloroformo Isomylalcohol
dATP	DesoxiAdenosin Trifosfato
dGTP	DesoxiGuanosin Trifosfato
dCTP	DesoxiCitodine Trifosfato
dTTP	DesoxiTriamidin Trifosfato
EDTA	Ethylenediaminetetracetic Ácido de Sodium Salt
g	Gramo (s)
M	Mol (ar)
mM	Micro mol
ml	Mililitro
Mq Water	Agua Calidad PCR
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PIC	Contenido de Información Polimórfica
Rpm	Revoluciones por minuto
SSR	Secuencia Simple de Repeticiones
TRIS	HydraxymethylAmimomethenlHydrochloride
TBE	Tris Ácido Bórico EDTA
µl	Microlitro

**Anexo 3:** Glosario de términos genéticos de la caracterización molecular del maíz pujagua rojo, 2017.

**ADN (Ácido desoxirribonucleico):** Base molecular de la herencia. Una molécula de ADN es un polímero de desoxinucleótidos ordenados en una doble hélice (dos hebras) de azúcares fosfatados con bases purinas y pirimidinas proyectados al centro. Cada hebra se mantiene unida por enlaces fosfodiéster entre los carbonos 3' y 5' de nucleótidos adyacentes.

**ADN Genómico:** ADN que incluye todas las secuencias de nucleótidos contenida en el genoma de un individuo. Término utilizado para referirse al ADN extraído mediante el uso de solventes (fenol) y detergentes (CTAB).

**Agarosa:** Polisacárido formado por galactosa alfa y beta que se extraen de las algas de los géneros *Gellidium* y *Gracillaria*. La agarosa es un producto natural que forma una matriz inerte y no tóxica que supone una herramienta indispensable en gran cantidad de técnicas de biología molecular, bioquímica y biología celular. Su uso más extendido es para construir geles que permitan separar moléculas de ADN mediante electroforesis.

**Alelo:** Cada una de las formas posibles de un gen.

**Alelos efectivos:** Número de alelos igualmente frecuentes en un grupo.

**Alineamiento de iniciadores:** Etapa de la PCR inmediatamente después de la desnaturalización, en la cual se baja la temperatura para permitir que los dos iniciadores se unan a las frecuencias flaqueantes del ADN por amplificar en cada una de las hebras.

**Amplificación:** Creación de numerosas copias de un segmento de ADN mediante PCR. Multiplicación repetida de una secuencia concreta de ADN.

**Bromuro de etidio:** Análogo de bases que se intercala en forma irreversible entre las bases de las moléculas de ADN. Cuando se le excita con la luz ultravioleta emite

fluorescencia de color naranja. Para teñir ADN en los geles es fluorescente cuando se le expone a la luz ultravioleta.

**Cebador:** Fragmentos cortos de ADN, monohebra de 10-20 bases, de secuencia aleatoria o arbitraria. Los cebadores se hibridan en aquellos sitios donde encuentran secuencias complementarias en el ADN usado como molde.

**Centrifugar:** separación de las moléculas por tamaño o densidad mediante fuerzas centrifugas por el giro de un rotor.

**Clon:** Grupo de células o de organismos genéticamente idénticos a partir de una misma célula u organismo por reproducción asexual. Grupo de plantas genéticamente idénticas obtenidas todas ellas por propagación vegetativa de un individuo seleccionado

**Cromosoma:** En las células eucariotas son los cuerpos nucleares que contienen la mayoría de los genes responsables en gran parte de la diferenciación y actividad celular.

**Desnaturalización del ADN:** Separación de las dos hebras que constituyen al ADN por rompimiento de los enlaces de hidrogeno entre bases complementarias. El ADN se desnaturaliza a temperaturas superiores a 90 °C. Primera etapa de la PCR.

**dNTPs (desoxinucleotidos):** Nucleótidos cuya pentosa es una desoxirribosa y por ende son los monómeros del ácido desoxirribonucleico.

**Extensión del ADN:** Tercera etapa en la PCR. La temperatura es elevada a 72 °C para permitir que una ADN *polimerasa* inicie la síntesis a partir del iniciador agregando *dNTPs* libres sobre la hebra que sirve de templado.

**Frecuencia alélica:** Proporción que se observa de un alelo específico respecto al conjunto de los que pueden ocupar un locus determinado en la población.

**Gen:** Unidad hereditaria que contiene información genética (ADN) que es transcrita a *ARNy* traducida a una cadena polipeptídica (proteína). En el genoma de un organismo, una

secuencia de nucleótidos a la que se le puede asignar una función específica.

**Genoma:** Término utilizado para referirse a todos los genes (información genética) contenida en un solo gameto, es decir un representante de cada cromosoma.

**Genotipo:** Constitución genética de un organismo, que estará dada por la información heredada por ambos padres. Específicamente para un solo locus, el genotipo estará dado por los alelos heredados por ambos padres.

**Población:** Individuos de la misma especie que habitan una determinada área geográfica y que por ende se entrecruzan y comparten un acervo común de genes.

**Heterocigoto:** Individuos con alelos no idénticos para un determinado gen o genes. La condición se denomina heterocigosis.

**Heterocigosidad:** Frecuencia media de individuos heterocigóticos para un locus o en promedio para varios locis. Es un estimador de la variabilidad genética en generaciones naturales o domesticadas.

**Microsatélite:** Pequeña secuencia entre dos y ocho nucleótidos que se repiten en tandes al azar a lo largo del genoma, en donde el número de repeticiones revela diferencias genéticas entre los individuos. Estos pueden ser dinucleótidos, trinucleotidos y tetranucleótidos.

**Marcador Molecular:** Fragmentos de ADN polimórficos que permiten distinguir entre individuos, familias, grupos o especies.

**Nucleótido:** Nucleosido (Base (purina o pirimidina) unida de forma covalente a un azúcar pentosa con uno o más grupos fosfatos unidos al hidroxilo 3 o 5 de una pentosa).

**Número de alelos:** Estimador de la variabilidad genética en grupos, se determina para cada muestra poblacional.

**Polimorfismo:** Variación alélica en un locus.

**Polimerasa:** Enzima que cataliza la formación de polímeros a partir de un monómero. Un ADN polimerasa sintetiza ADN a partir de desoxinucleotidos trifosfato utilizando una hebra complementaria de ADN y cebador.

**Polimerasa Taq:** ADN polimerasa termo estable aislada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*, muy utilizada en PCR.

**PCR (del inglés polymerase Chain Reaction) Reacción en la cadena de la polimerasa:**

Técnica con la que se copian las hebras complementarias de una molécula de ADN blanco simultáneamente a través de una serie de ciclos, que incluyen una desnaturalización del ADN, alineamiento de iniciadores y extensión (Síntesis) mediante una polimerasa (comúnmente *Taq polimerasa*).

**Secuenciación:** Establecimiento del orden de las bases nucleotídicas (Secuencia) de 5' a 3' en un fragmento de ADN de interés

**Anexo 4:** Protocolos de los marcadores optimizados para PCR de las tres generaciones de maíz pujagua rojo, 2017

**Marcador BNLG 127**

Programa en termociclador	Solución Stock			Electroforesis
	25 ul – x16 muestras			
95°C ----- 3 minutos	Master Mix	12.5	200	Methaphor agarosa 2%  120 minutos 90 voltios 330 amp  Tiñidor 6x 4ul Ladder 100-1000 PB 4ul
95°C ----- 30 segundos 49°C ----- 30 segundos 72°C----- 1 minuto	Forward	1	16	
	Reverse	1	16	
	Agua libre	9.5	152	
72°C----- 10 minutos -4° c	ADN	1		

**Marcador BNLG 1272**

Programa en termociclador	Solución Stock			Electroforesis
	25 ul – x16 muestras			
95°C ----- 3 minutos	Master Mix	12.5	200	Methaphor agarosa 2%  120 minutos 90 voltios 330 amp  Tiñidor 6x 4ul Ladder 100-1000 PB 4ul
95°C ----- 30 segundos 52°C ----- 30 segundos 72°C----- 1 minuto	Forward	1	16	
	Reverse	1	16	
	Agua libre	8.5	152	
72°C----- 10 minutos -4° c	ADN	2		

**Marcador PHI 119**

Programa en termociclador	Solución Stock			Electroforesis
	25 ul – x18 muestras			
95°C ----- 3 minutos	Master Mix	12.5	225	Methaphor agarosa 2%  120 minutos 90 voltios 330 amp  Tiñidor 6x 4ul Ladder 100-1000 PB 4ul
95°C ----- 30 segundos 52°C ----- 30 segundos 72°C----- 1 minuto	Forward	1	18	
	Reverse	1	18	
	Agua libre	9.5	171	
72°C----- 10 minutos -4° c	ADN	1		

### Marcador BNLG 197

Programa en termociclador	Solución Stock			Electroforesis
	25 ul – x16 muestras			
95°C ----- 3 minutos	Master Mix	12.5	200	Methaphor agarosa 2%  120 minutos 90 voltios 330 amp  Tiñidor 6x 4ul Ladder 50-2000 PB 6ul
95°C ----- 30 segundos	Forward	1	16	
60°C ----- 30 segundos	Reverse	1	16	
72°C----- 1 minuto	Agua libre	9.5	152	
72°C----- 10 minutos	ADN	1		
-4° c				

### Marcador PHI 057

Programa en termociclador	Solución Stock			Electroforesis
	25 ul – x16 muestras			
95°C ----- 3 minutos	Master Mix	12.5	200	Methaphor agarosa 2%  120 minutos 90 voltios 330 amp  Tiñidor 6x 4ul Ladder 50-2000 PB 6ul
95°C ----- 30 segundos	Forward	1	16	
51.7°C ----- 30 segundos	Reverse	1	16	
72°C----- 1 minuto	Agua libre	9.5	152	
72°C----- 10 minutos	ADN	1		
-4° c				

### Marcador BNLG 400

Programa en termociclador	Solución Stock			Electroforesis
	25 ul – x16 muestras			
95°C ----- 3 minutos	Master Mix	12.5	200	Methaphor agarosa 2%  120 minutos 90 voltios 330 amp  Tiñidor 6x 4ul Ladder 50-2000 PB 6ul
95°C ----- 30 segundos	Forward	1	16	
51.7°C ----- 30 segundos	Reverse	1	16	
72°C----- 1 minuto	Agua libre	8.5	144.5	
72°C----- 10 minutos	ADN	2		
-4° c				

### Marcador NC 013

Programa en termociclador	Solución Stock			Electroforesis
	25 ul – x18 muestras			
95°C ----- 3 minutos	Master Mix	12.5	225	Methaphor agarosa 2% 120 minutos 90 voltios 330 amp Tiñidor 6x 4ul Ladder 50-2000 PB 6ul
95°C ----- 30 segundos 50.8°C ----- 30 segundos 72°C----- 1 minuto	Forward	1	16	
	Reverse	1	16	
	Agua libre	8.5	153	
72°C----- 10 minutos -4° c	ADN	2		

### Marcador BNLG 1600

Programa en termociclador	Solución Stock			Electroforesis
	25 ul – x18 muestras			
95°C ----- 3 minutos	Master Mix	12.5	225	Methaphor agarosa 2% 120 minutos 90 voltios 330 amp Tiñidor 6x 4ul Ladder 50-2000 PB 6ul
95°C ----- 30 segundos 53°C ----- 30 segundos 72°C----- 1 minuto	Forward	1	16	
	Reverse	1	16	
	Agua libre	9.5	153	
72°C----- 10 minutos -4° c	ADN	1		

### Marcador PHI 063

Programa en termociclador	Solución Stock			Electroforesis
	25 ul – x16 muestras			
95°C ----- 3 minutos	Master Mix	12.5	200	Methaphor agarosa 2% 120 minutos 90 voltios 330 amp Tiñidor 6x 4ul Ladder 50-2000 PB 6ul
95°C ----- 30 segundos 53°C ----- 30 segundos 72°C----- 1 minuto	Forward	1	16	
	Reverse	1	16	
	Agua libre	9.5	152	
72°C----- 10 minutos -4° c	ADN	1		

**Marcador PHI 112**

Programa en termociclador	Solución Stock			Electroforesis
	25 ul – x16 muestras			
95°C ----- 3 minutos	Master Mix	12.5	200	Methaphor agarosa 2%  120 minutos 90 voltios 330 amp Tiñidor 6x 4ul Ladder 50-2000 PB 6ul
95°C ----- 30 segundos 52.8°C ----- 30 segundos 72°C----- 1 minuto	Forward	1	16	
	Reverse	1	16	
	Agua libre	9.5	152	
72°C----- 10 minutos -4° c	ADN	1		

**Marcador UMC 1792**

Programa en termociclador	Solución Stock			Electroforesis
	25 ul – x16 muestras			
95°C ----- 3 minutos	Master Mix	12.5	200	Methaphor agarosa 2%  120 minutos 90 voltios 330 amp  Tiñidor 6x 4ul Ladder 50-2000 PB 6ul
95°C ----- 30 segundos 52.8°C ----- 30 segundos 72°C----- 1 minuto	Forward	1	16	
	Reverse	1	16	
	Agua libre	9.5	152	
72°C----- 10 minutos -4° c	ADN	1		

**Marcador BNLG 1839**

Programa en termociclador	Solución Stock			Electroforesis
	25 ul – x16 muestras			
95°C ----- 3 minutos	Master Mix	12.5	200	Methaphor agarosa 2%  120 minutos 90 voltios 330 amp Tiñidor 6x 4ul Ladder 50-2000 PB 6ul
95°C ----- 30 segundos 53°C ----- 30 segundos 72°C----- 1 minuto	Forward	1	16	
	Reverse	1	16	
	Agua libre	8.5	136	
72°C----- 10 minutos -4° c	ADN	2		

### Marcador UMC 1464

Programa en termociclador	Solución Stock			Electroforesis
	25 ul – x16 muestras			
95°C ----- 3 minutos	Master Mix	12.5	200	Methaphor agarosa 2%  120 minutos 90 voltios 330 amp Tiñidor 6x 4ul Ladder 50-2000 PB 6ul
95°C ----- 30 segundos	Forward	1	16	
53°C ----- 30 segundos	Reverse	1	16	
72°C----- 1 minuto	Agua libre	9.5	152	
72°C----- 10 minutos	ADN	1		
-4° c				

### Marcador PHI 026

Programa en termociclador	Solución Stock			Electroforesis
	25 ul – x16 muestras			
95°C ----- 3 minutos	Master Mix	12.5	200	Methaphor agarosa 2%  120 minutos 90 voltios 330 amp Tiñidor 6x 4ul Ladder 50-2000 PB 6ul
95°C ----- 30 segundos	Forward	1	16	
53°C ----- 30 segundos	Reverse	1	16	
72°C----- 1 minuto	Agua libre	8.5	136	
72°C----- 10 minutos	ADN	2		
-4° c				

### Marcador BNLG 1176

Programa en termociclador	Solución Stock			Electroforesis
	25 ul – x16 muestras			
95°C ----- 3 minutos	Master Mix	12.5	200	Methaphor agarosa 2%  120 minutos 90 voltios 330 amp Tiñidor 6x 4ul Ladder 100-1000 PB 6ul
95°C ----- 30 segundos	F	1	16	
53°C ----- 30 segundos	R	1	16	
72°C----- 1 minuto	Agua libre	9.5	152	
72°C----- 10 minutos	ADN	1		
-4° c				

Anexo 5. Fotografías de la realización del estudio en las tres generaciones de maíz pujagua rojo, 2017.



