

Asociación de marcadores  
morfológicos y moleculares ISTR y  
SSR con heterosis en generaciones F1  
y F2 de maíz (*Zea mays* L.)

Tesis

que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biosistemática y  
Manejo de Recursos Naturales y  
Agrícolas

Presenta

Ana Karen Rodríguez Ponce

Asociación de marcadores  
morfológicos y moleculares ISTR y  
SSR con heterosis en generaciones F1  
y F2 de maíz (*Zea mays*)

Tesis

que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biosistemática y  
Manejo de Recursos Naturales y  
Agrícolas

Presenta

Ana Karen Rodríguez Ponce

Director

Dra. Martha Escoto Delgadillo



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

## Asociación de marcadores morfológicos y moleculares ISTR y SSR con heterosis en generaciones F1 y F2 de maíz (*Zea mays* L.).

Por

Lic. Ana Karen Rodríguez Ponce

Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos  
Naturales y Agrícolas

Aprobado por:

*Martha E*

\_\_\_\_\_  
Dra. Martha Escoto Delgadillo  
Director de Tesis e integrante del jurado

*13/01/2016*  
\_\_\_\_\_  
Fecha

*M. Isabel*

\_\_\_\_\_  
Dra. Martha Isabel Torres Morán  
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

*13 enero 2016*  
\_\_\_\_\_  
Fecha

*J. Jesús Sánchez*

\_\_\_\_\_  
Dr. José de Jesús Sánchez González  
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

*13/ene/2016*  
\_\_\_\_\_  
Fecha

*Lino*

\_\_\_\_\_  
Dr. Lino De la Cruz Larios  
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

*13 enero 2016*  
\_\_\_\_\_  
Fecha

*Paulina V*

\_\_\_\_\_  
Dra. Ana Paulina Velasco Ramírez  
Sinodal e integrante del jurado

*13 enero 2016*  
\_\_\_\_\_  
Fecha

**Asociación de marcadores morfológicos y moleculares  
ISTR y SSR con heterosis en generaciones F1 y F2 de  
maíz (*Zea Mays* L.).**

**.Por**

**Lic. Ana Karen Rodríguez Ponce**

**Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales  
y Agrícolas**

**Miembros del comité particular**

**Dra. Martha Escoto Delgadillo**

**Director de Tesis**

**Dra. Martha Isabel Torres Morán**

**Asesor del Comité Particular**

**Dr. José de Jesús Sánchez González**

**Asesor del Comité Particular**

**Dr. José Ron Parra**

**Asesor del Comité Particular**

**Dr. Lino De la Cruz Larios**

**Asesor del Comité Particular**

## **SEDE**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Marcadores Moleculares perteneciente al Instituto de Manejo y Aprovechamiento de los Recursos Fitogenéticos, Departamento de Producción Agrícola del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara

*Si sigues al guía interior te sentirás más total, más integrado, como si te estuvieras moviendo hacia afuera desde el propio centro de tu ser. Si te mueves con él, este rayo de luz te llevará a donde necesitas ir exactamente.*

*Osho Sen*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la ayuda económica otorgada.*

*A mi madre Martha Patricia, por toda su ayuda, apoyo, paciencia y amor incondicional que he tenido durante todas las etapas de mi vida, por estar presente en cada momento de mi vida personal y profesional y ayudarme a levantarme en todos mis tropiezos.*

*A mi padre Salvador, por estar presente en este momento tan importante para mí que es mi carrera profesional.*

*A mis hermanos Iván y Yessi, que siempre sé que puedo contar con ustedes, por su apoyo brindado en cada momento importante en mi vida, por ayudarme a seguir adelante y porque gracias a ustedes soy la persona que soy.*

*A mi mentora y amiga la Dra. Isabel, por ser la persona que necesitaba que me empujara en mi vida, que me guiara, que confiara y lo más importante, que creyera en mí, por darme esa confianza que necesitaba para salir adelante y hacerme creer que nada es imposible si en verdad se quiere superar, gracias por absolutamente todo. Y sobre todo la paciencia que le tuviste todo este tiempo a esta cabezona.*

*A mi Directora la Dra. Martha, por su apoyo y aprendizaje que me otorgo en esta nueva etapa de mi vida.*

*A mis asesores, el Dr. José de Jesús Sánchez, el Dr. José Ron Parra y el Dr. Lino De la Cruz, por la paciencia que me tuvieron al enseñarme muchas cosas nuevas para mí, por la dedicación que otorgaron todo este tiempo, por sus valiosas aportaciones y oportunos comentarios para la culminación del presente trabajo.*

*A la Dra. Patricia Zarazúa y a Yuri, por la ayuda y apoyo que me otorgaron durante este periodo.*

*A mis compañeros y amigos del Laboratorio Paulina, Alejandro, Julio, Efraín, Víctor, Samuel, Fernanda, Guillermo, por hacer ameno el trabajo, por todos aquellos momentos que se compartieron dentro y fuera del laboratorio, por dar los ánimos que se necesitan con risas y comentarios graciosos para poder olvidar que muchas veces las cosas no salen como se planean y sobre todo por las ayudas que me otorgaron en múltiples ocasiones.*

*A mis Padrinos, por el apoyo incondicional que han tenido durante toda mi vida y por estar presentes en esta etapa que es muy importante para mí.*

*A todas aquellas personas importantes para mí que han estado apoyándome en cada momento, ayudándome a levantándome y regañando cada vez que estoy por rendirme, gracias*

## INDICE

<b>I</b>	<b>RESUMEN .....</b>	<b>12</b>
<b>II</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>13</b>
<b>III</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>14</b>
<b>IV</b>	<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>16</b>
	<b>2.1 La investigación en maíz .....</b>	<b>16</b>
	<b>2.2 Implicaciones genéticas de la autofecundación y pureza varietal .....</b>	<b>16</b>
	<b>2.3 La heterosis en plantas .....</b>	<b>18</b>
	2.3.1 Teoría de la heterocigosis .....	21
	2.3.2 Teoría de dominancia.....	21
	<b>2.5. Heterosis en maíz .....</b>	<b>22</b>
	<b>2.4 Patrones heteróticos y grupos heteróticos. ....</b>	<b>23</b>
	<b>2.6 Caracterización de los recursos fitogenéticos.....</b>	<b>23</b>
	<b>2.7 Marcadores moleculares ISTR y SSR .....</b>	<b>27</b>
	2.7.1 ISTR (Inverse Sequence Tagged Repeat) .....	27
	2.7.2 SSR (Short Sequence Repeats) o microsatélites.....	29
<b>V</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
	<b>3.1 Objetivo general.....</b>	<b>32</b>
	<b>3.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>32</b>
	<b>3.3 Hipótesis.....</b>	<b>32</b>
<b>VI</b>	<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>33</b>
	<b>4.1 Sitio de estudio .....</b>	<b>33</b>
	<b>4.2 Material Biológico .....</b>	<b>33</b>
	4.2.1 Pureza varietal.....	33
	4.2.2 Heterosis .....	34
	4.2.3 Caracterización agronómica.....	35
	4.2.4 Prácticas agronómicas realizadas.....	36
	<b>4.3 Extracción de ADN.....</b>	<b>36</b>
	<b>4.4 SSR (Microsatélites).....</b>	<b>37</b>
	<b>4.5 ISTR .....</b>	<b>37</b>
	<b>4.6 Análisis de datos .....</b>	<b>38</b>
	4.6.1 Pureza varietal.....	38
	4.6.2 Análisis de las variables agronómicas .....	39
	4.6.3 Heterosis .....	39
	4.6.4 Comparación entre matrices.....	40
<b>VII</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
	<b>5.1 SSR (Microsatélites).....</b>	<b>41</b>
	<b>5.2 ISTR .....</b>	<b>41</b>

5.3 Datos Agronómicos .....	42
5.4 Pureza varietal .....	43
5.5 Análisis de las variables agronómicas.....	46
5.6 Heterosis.....	47
5.7 Comparación entre las versiones .....	49
5.8 Comparación entre matrices.....	51
VIII DISCUSIÓN .....	52
IX CONCLUSIONES .....	55
X LITERATURA CITADA.....	56

## INDICE DE FIGURA

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Patrón de amplificación para el iniciador phi076 de SSR en maíz. a) Padres LUG03 y LUG282 de la versión II; b) Generación F1 de la cruce LUG03xLUG282 versión II; c) Generación F2 de la cruce LUG03xLUG282 versión II. M= marcador de peso molecular 100 pb	36
2	Patrón de amplificación para la combinación F31-B1 de ISTR. M= marcador de peso molecular 100 pb.	37
3	Mazorcas cosechadas en el diseño experimental en campo. a) Padres, generación F1 y F2 de LUG03 y CML282 de la versión I; b) Padres, generación F1 y F2 de LUG282 y CML282 de la versión I.	38
4	Dendrograma de asociación de parentales, F1 y F2 de maíz, producido por datos generados con SSR.	39
5	Dendrograma de asociación de parentales, F1 y F2 de maíz, producido por datos generados con ISTR	39
6	Dendrograma de asociación de parentales, F1 y F2 de maíz, producido por datos generados con datos agronómicos	40
7	Heterosis con respecto al valor del mejor padre	43
8	Heterosis con respecto al promedio de los padres	43
9	Comparación entre los materiales parentales	44
10	Comparación entre los materiales LUG03 y LUG282 en sus dos versiones.	45
11	Comparación entre los materiales LUG entre sí en sus dos versiones.	45

**INDICE DE CUADROS**

<b>Cuadro</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Líneas y cruzas utilizadas en el presente trabajo	29
2	Ubicación de los iniciadores para SSR de maíz, e información complementaria para su aplicación en PCR	32
3	Secuencias de los iniciadores para el marcador ISTR utilizados en el presente trabajo.	33
4	Clave para la comparación de distancias genéticas entre los materiales utilizados.	34
5	Promedios de las variables medidas	41
6	Heterosis para el rendimiento de grano y altura de planta entre líneas e híbridos.	42
7	Distancias genética entre líneas e híbridos.	42
8	Correlación de las matrices de similitud derivadas de marcadores moleculares ISTR, SSR y datos agronómicos.	46

## I RESUMEN

El mejoramiento genético del maíz, es un proceso continuo para la formación de híbridos y variedades. Los estudios de caracterización de la diversidad genética son una herramienta que ayuda a tener un control más efectivo de la constitución genética, por lo tanto definir a nivel molecular los patrones de variación, puede ser relevante para la incorporación de individuos a programas de mejoramiento. Los objetivos del presente trabajo fue determinar mediante los marcadores SSR e ISTR, la pureza varietal de una línea de maíz multiplicada por autofecundaciones, realizar cruzas y detectar expresión heterótica en generaciones F1 y F2. Se tomaron en cuenta cinco líneas de maíz LUG03 I, LUG282 I, CML282 I, LUG282 II y LUG03 II. Posteriormente se realizaron las cruzas para la obtención de la generación F1 y F2, y se llevaron a cabo las extracciones de ADN. Con las matrices producidas con cada marcador, se obtuvieron datos para distancia genética. Con los datos producidos, se observó que la craza que produjo mayor rendimiento, fue la craza LUG282 x LUG03 II en F1, la distancia genética que se encontró para esta craza, difiere según el marcador de referencia, para distancias producidas por SSRs el valor 0.412, para ISTRs 1.3774 y para datos agronómicos 1.5178. La menor distancia genética se detectó fue con el marcador SSR en la craza CML282 x LUG282 en F2 con 0.165 y la mayor distancia detectada fue en los marcadores ISTR en la craza LUG282 x LUG03 F1 de la versión I con 2.0794. Las diferencias encontradas entre la heterosis producida por los materiales de las diferentes versiones, concuerdan con las diferencias entre ellos detectadas a nivel molecular. Según los resultados obtenidos con el presente trabajo, se concluye que sí es posible detectar la pureza varietal entre líneas autofecundadas, utilizando los marcadores moleculares SSR e ISTR.

## II ABSTRACT

Maize breeding is a continuous process for the formation of hybrids and varieties. Characterization studies of genetic diversity are necessary that helps to assess genetic constitution and defining variation patterns at molecular level. The objectives of this work was determined by the SSR and ISTR markers, the varietal purity of maize multiplied by selfpollination, make crosses and detect heterotic expression in F1 and F2 generations. Five lines of corn LUG03 I, LUG282 I, CML282 I, II and LUG03 LUG282 II were considered. F1 and F2 generation were performed. DNA isolation was made from all individuals. Results shows the cross between the lines LUG03 X LUG282 version II in F1, produces a high yield and the genetic distance for this cross, differs among to the reference marker. The values for distances were 0.412 with SSRs, for ISTRs 1.3774 and 1.5178 for agronomic data. The lowest genetic distance was detected with SSR marker in the cross CML282 x LUG282 in F2 with 0.165 and the greatest distance was detected in the ISTR markers in F1 crosses LUG282 x LUG03 R version 2.0794. The differences in heterosis, between parentals, F1 and F2 in yield, fits with differences found trough SSR. By other hand, according to the results it can be concluded that it is possible to detect the varietal purity between selfpollinated lines using molecular markers.

### III INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays*) es el cultivo que ocupa el segundo lugar en importancia a nivel mundial, debido a la superficie que se cultiva y el valor de su producción ligeramente menor al del trigo. México posee el séptimo lugar en producción mundial, de ahí la importancia de ese cultivo en nuestro país (Sánchez, 2003; Agropanorama, 2012).

El mejoramiento genético del maíz, es un proceso continuo para la formación de híbridos y variedades. Al mejorar un cultivo, es importante conocer el componente genético de los materiales usados como progenitores. En todo programa de mejoramiento genético, la elección de germoplasma progenitor es una de las decisiones más importantes que se deben tomar. Por ello, es importante tomar en cuenta muchos aspectos del cultivo, desde el punto de vista genético, entre los cuales se encuentra la expresión fenotípica, controlada tanto por los genes como por el ambiente.

La heterosis es el fenómeno en virtud del cual la cruce (F1) entre dos razas, dos variedades, dos líneas, etcétera, producen un híbrido que es superior en tamaño, rendimiento o vigor general. Algunos investigadores hablan de heterosis cuando F1 es superior en vigor al promedio de los progenitores; otros consideran como una manifestación de heterosis cuando F1 es superior al vigor del progenitor más vigoroso y tiene consiguiente mayor importancia económica.

Heterosis es un fenómeno de herencia cuantitativa que se conoce desde hace más de 250 años y aún no ha sido claramente explicado, aunque diversas teorías han tratado de buscar la solución sobre la base de los conocimientos mendelianos y de la aplicación de la estadística (Reyes, 1985).

A pesar del interés fundamental en la base molecular de la manifestación de heterosis, existen aspectos que son de gran importancia debido al alto impacto potencial sobre el mejoramiento de cultivos. Hasta ahora, la base molecular de la heterosis o vigor híbrido es todavía desconocida, los análisis genéticos y moleculares indican la complejidad del fenómeno, y es probable que más de un mecanismo esté implicado en la formación de heterosis. Las teorías genéticas clásicas (dominio, sobre dominancia, epistasis) que tratan

de explicar el mecanismo de la heterosis a nivel genético, no son capaces de predecir el rendimiento híbrido. Además, la heterosis parece depender de las condiciones ambientales, lo cual hace que su predicción sea aún más complicada. Aunque se han desarrollado métodos de predicción basados en marcadores genéticos para ayudar a la selección de las mejores líneas endogámicas en un programa de cría, los criadores de hoy en día son todavía dependientes de llevar a cabo una gran cantidad de ensayos de campo. Estas pruebas de campo consumen mucho tiempo, costo intensivo y sólo es capaz de cubrir una pequeña parte de todos los posibles cruces entre las líneas parentales disponibles. Por lo tanto el avance de la predicción de la heterosis por métodos moleculares alternativos y combinados, para hacer ensayos de campo prescindible en mayor medida, es un enfoque prometedor y necesario en los programas de mejoramiento de cultivos.

## IV ANTECEDENTES

### 2.1 La investigación en maíz

Es innegable la importancia que tiene el cultivo del maíz en México. Se ha cultivado por varios miles de años y su relación con el pueblo mexicano, es muy estrecha. Según Esteva y Marielle (2003), “para al menos una tercera parte de los mexicanos de hoy, el maíz sigue siendo el eje rector de la vida cotidiana. Alrededor de él, se tejen las tareas y celebraciones de hombres, mujeres y niños, en la milpa, lo mismo que en el hogar: la atención de la parcela, la preparación del nixtamal, la masa y las tortillas, la conservación y el cuidado de la cosecha, el desgrane de la mazorca, la alimentación de los animales, la comida cotidiana, las fiestas, los rituales...” según estos autores, todo guarda relación con el maíz. Desde esa perspectiva, es muy comprensible que uno de los focos centrales de atención en la actividad científica de nuestro país, sea precisamente, el maíz.

Las actividades de mejoramiento genético de maíz en nuestro país, fueron impulsadas con el establecimiento de la Oficina de Estudios Especiales (OEE) en 1943 como un programa cooperativo para la investigación en cultivos alimenticios, entre la Secretaría de Agricultura y Ganadería (SAG) de México y la Fundación Rockefeller de los EUA. A fines de 1960 concluyen los trabajos de la OEE y la SAG estableció el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) (Angeles, 2000). Más tarde se formó oficialmente en 1966 el CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo), donde expertos mexicanos y extranjeros emprendieron una importante tarea encaminada a recolectar y catalogar las diversas razas de maíz en México. Actualmente, la riqueza genética de este recurso, puede encontrarse resguardada en bancos de germoplasma, que la intercambian, conservan y administran.

### 2.2 Implicaciones genéticas de la autofecundación y pureza varietal

Uno de los procedimientos para la conservación de las semillas en los bancos de germoplasma es la autofecundación, que en términos genéticos, produce una progenie que en teoría debe ser más uniforme que la producida por polinizaciones cruzadas. Hay que mencionar que debido a la meiosis, la progenie puede tener un cierto porcentaje de

variabilidad con respecto a sus padres, ya que esa es la característica de la reproducción sexual. En los bancos de germoplasma y en los programas de mejoramiento genético, un objetivo es conservar las líneas puras que generan híbridos prometedores, atendiendo debidamente a la conservación de la variabilidad que permite que aparezcan individuos resistente o tolerantes a enfermedades y a ambientes adversos (Porceddu y Jenkins, 1981).

La regeneración de accesiones de semilla, debe considerar las características genéticas de las especies, sus mecanismos reproductivos y los efectos ambientales. Estas son las principales tareas y dificultades del manejo de colecciones de semilla. Según la EASAC (European Academies Science Advisory Council) la integridad genética de una población se pierde fácilmente si no se reproduce de forma aislada en un ambiente favorable, similar a donde se colectó. Factores como la presión de selección, el flujo genético unidireccional y los efectos del ambiente en el sistema de apareamiento, pueden producir un cambio importante en la estructura genética de la población, con la fijación de unos alelos y la pérdida de otros (Porceddu y Jenkins, 1982; EASAC, 2011).

Las principales causas de la pérdida de la pureza varietal son:

1. Variaciones en el desarrollo de la planta.
2. Mezclas mecánicas.
3. Mutaciones
4. Cruzamiento natural
5. Variaciones en el desarrollo de las plantas
6. Presión de selección ejercida por plagas y enfermedades
7. La técnica del mejorador

La pureza varietal en un cultivo, es importante desde muchos puntos de vista. La producción de semillas con alta calidad, la conservación de genes importantes, la ubicación de genes deletéreos y la capacidad heterótica, así como la aptitud combinatoria pueden verse modificadas cuando los materiales iniciales no tienen la pureza varietal que se espera.

La conservación de la pureza varietal, requiere de un manejo en campo técnicamente exigente y una inversión de tiempo, dinero y esfuerzo considerables con respecto a la producción comercial de cualquier cultivo (EASAC, 2011).

### 2.3 La heterosis en plantas

La heterosis es una importante propiedad de las especies híbridas, de hecho una de las más importantes a considerar en la creación de híbridos y en mejoramiento genético. Se define como la capacidad de los híbridos de superar a sus progenitores en propiedades deseables como mayor crecimiento, mayor fertilidad, tolerancia a patógenos y otras propiedades convenientes. El fenómeno aparentemente ha sido reconocido en una forma u otra durante siglos por diferentes civilizaciones (Chen, 2010) pero ha sido objeto de investigación científica desde Darwin (1876), en ausencia de la genética y por más de 100 años con las consideraciones genéticas (Shull, 1908; Bruce, 1910; Jones, 1917).

Actualmente, los diferentes medios de información indican que varios millones de seres humanos padecen de hambre y muchos millones mueren por falta de alimento, estos datos indican la importancia socioeconómica de la fitogenotecnia, que entre sus diferentes metodologías utiliza el fenómeno de la heterosis para la obtención de mayor producción. La explotación comercial de “vigor híbrido” data desde los tiempos bíblicos, cuando los pueblos antiguos del Medio Oriente explotaron comercialmente la cruce intergenérica del ganado caballar, por el asno en la producción del híbrido estéril conocido como “mula”. La aplicación en plantas, en grandes áreas se inicia en la década de 1930 con la formación del “maíz híbrido” en la faja maicera de Estados Unidos de América, tecnología que se extiende hacia Europa y América Latina. En la actualidad se producen híbridos en sorgo, maíz, caña de azúcar, algodón, frutales, hortalizas, etc., y es, tal vez, la aplicación de la heterosis en la producción de alimento, lo más relevante en la historia de la agricultura y de la humanidad (Reyes, 1985).

El éxito de cualquier programa genético con énfasis en el desarrollo de líneas endocriadas para la formación de híbridos, dependerá de la elección del germoplasma para considerarse dentro del programa de mejoramiento. Asimismo, el mejorador requiere de un conocimiento amplio del tipo de acción génica de los materiales en estudio de los caracteres de mayor importancia económica tales como alto potencial de rendimiento, resistencia genética a las mayores plagas y enfermedades dentro de la población de macroambientes del área bajo estudio. Lo anterior permitirá elegir el mejor esquema de mejoramiento que maximice la varianza genética y de esta forma incrementar y fijar la frecuencia de genes

favorables en la población parental. De tal forma que elección de variedades para ser usados como población base en un programa de selección recurrente dependerá de, 1) media de comportamiento de los variedades, 2) heterosis varietal, y 3) de la variación genética dentro de la población.(Navarro y Borrego, 1993)

Un propósito importante del mejoramiento genético de maíz por hibridación es generar cruzas que superen en rendimiento de grano a las variedades locales criollas y mejoradas. (Escorcia, y col. 2010). La conformación genética de las diferentes variedades comerciales, entre ellas los híbridos, implica un gran trabajo por parte de los investigadores además del desarrollo de costosos programas de mejoramiento. Este hecho junto con la aparición en el mercado de un gran número de cultivares ha promovido el desarrollo de una legislación que les concede a los creadores los derechos de propiedad industrial de las obtenciones vegetales, y les permite un control sobre la propagación y comercialización de sus cultivares (Bonamico, y col. 2004).

El término heterosis se debe a G. H. Shull (1914), que lo usó como una contracción de la expresión “expresión de la heterosis” y desde entonces se viene usando comúnmente el término como sinónimo de “vigor híbrido” por el efecto que se manifiesta en la generación F1 al presentarse un estímulo general en el híbrido. Esta manifestación consiste en un incremento en la producción, en la altura, en la resistencia de plagas, a sequía, a enfermedades, o cualquier otra característica que expresa mayor vigor que el que manifiesta el promedio de los progenitores o el progenitor más vigoroso. La heterosis es mayor en la F1 y los individuos presentan una uniformidad similar a los P1 cuando estos son homocigotes no relacionados, es decir, genéticamente diferentes. Lo anterior indica que todos los individuos de la F1 tienen el mismo genotipo y la variación que se manifiesta será ambiental. En la generación F2 la manifestación del vigor disminuye y la variación es alta, lo cual sugiere una segregación, tanto para los genes que determinan caracteres cuantitativos como para aquellos que determinan caracteres cualitativos. La variación observada obedece, por lo tanto, a causas genéticas y causas del medio ambiente diferentes para cada uno de los individuos que integran la población F2 (Reyes, 1985).

Cuando la cruce se hace entre poblaciones heterocigotes también se ha encontrado heterosis, aun cuando en menor grado y la F1 es tan variable como cualquier progenitor. En la generación F2 la variación es mayor y la heterosis disminuye.

En ambos casos descritos, aun cuando el vigor de F2 es menor que el de F1, comúnmente dicho vigor es mayor que el que manifiesta el promedio de los progenitores o el progenitor vigoroso.

Dos términos que se utilizan habitualmente en la discusión de modelos de heterosis. Uno de ellos es el llamado modelo de "dominancia", en el que los alelos recesivos en diferentes loci se complementan en el híbrido, y el segundo es el llamado modelo "sobre dominancia", que postula que las interacciones entre diferentes alelos se producen en el híbrido, lo que lleva al aumento en el vigor.

La hipótesis de la dominancia genética atribuye la superioridad de los híbridos para el enmascaramiento de expresión de alelos recesivos indeseables de uno de los padres por los alelos dominantes de la otra. La hipótesis sobre dominancia genética indica que algunas combinaciones de alelos son especialmente ventajosas cuando se combina en un individuo heterocigótico. Esta hipótesis se invoca comúnmente para explicar la persistencia de algunos alelos que son perjudiciales en los homocigotos. En circunstancias normales, estos alelos perjudiciales serían retirados de una población a través del proceso de la selección natural. Al igual que la hipótesis de la dominancia, que atribuye los malos resultados de las líneas puras de expresión de tales alelos recesivos perjudiciales. En cualquier caso, los apareamientos cruzamiento lejanos proporcionan el beneficio de enmascarar alelos recesivos deletéreos en la progenie. (Reyes, 1985).

Según Márquez (1988) las hipótesis sobre la heterosis no han sido probadas con contundencia y debido a que no es posible aislar los genes individualmente, las explicaciones deben basarse en los tipos generales de acción génica presentes en la herencia de caracteres cuantitativos, es decir, en la herencia Mendeliana.

El vigor híbrido se ha tratado de explicar considerando aspectos fisiológicos y aspectos genéticos.

Fisiológicos: Shull en 1908, atribuye el vigor híbrido a un estímulo fisiológico ocasionado por la fusión de dos gametos haploides genéticamente diferentes que originan un cigote heterocigote y un citoplasma desbalanceado, de origen únicamente materno.

Ashby (1930-1937) indicó el concepto de “ventaja inicial”; según esta idea la heterosis era debida a que el embrión del híbrido era mayor al embrión de cualquier progenitor y que esta ventaja inicial se conserva hasta el final. Varios experimentos mostraron que había casos en que no había esa ventaja inicial del embrión y, sin embargo, se manifestaba el fenómeno heterosis (Reyes, 1985).

Genéticos: los genetistas han tratado de explicar la heterosis en varias teorías, dos de ellas han sido las más importantes.

- Teoría de la heterocigosis
- Teoría de dominancia

### 2.3.1 Teoría de la heterocigosis

Conocida también como teoría de la interacción de alelos, complemento intragénico o sobre dominancia, sostiene que la heterocigosis, *per-se*, es responsable del mayor vigor del híbrido. Esta teoría sostenida por Shull y East (1908) argumenta a favor de ella lo siguiente:

Si dos líneas puras, homocigotes, o dos plantas autógamias (no emparentados) se cruzan, se manifiesta heterosis.

Si una planta alógama se autofecunda, su vigor disminuye.

La manifestación de vigor de F1 mayor que el más vigoroso de los P1 se puede atribuir a un efecto de sobre dominancia. (Reyes, 1985).

### 2.3.2 Teoría de dominancia

Esta teoría supone lo siguiente: el mayor vigor de F1 se debe a que en el cigote del híbrido se reúnen los genes favorables dominantes de los dos progenitores y, además, a la presencia en el cigote de factores complementarios aportados por dichos progenitores. Es decir, esta teoría supone:

Los caracteres favorables para vigor están determinados por genes dominantes

Los caracteres desfavorables para vigor están determinados por genes recesivos.

La F1 únicamente exhibe genes dominantes en todos los loci; luego, el mayor vigor se puede atribuir a la reunión de los genes dominantes favorables. Puede también atribuirse a la acción de genes complementarios, por ejemplo A y B reunidos en híbrido F1; es decir interacción de genes dominantes favorables no alelos. (Reyes, 1985).

## 2.5. Heterosis en maíz

Un híbrido, es una cruce entre dos líneas puras. Para la obtención de híbridos en maíz, es preciso partir de líneas puras obtenidas por autofecundación (con ellas mismas hasta alcanzar la homocigosis). Las líneas puras que pueden generar híbridos, generalmente presentan una depresión de vigor, producida por las autofecundaciones.

Pocas mejoras agronómicas se realizaron durante el siglo 20 en el desarrollo de maíz híbrido (*Zea mays* L) (Duvick, 2001). Los rendimientos aumentaron dramáticamente a medida que los mejoradores se alejaron de variedades de polinización libre (OPV) y comenzaron a desarrollar híbridos. El concepto híbrido y línea pura tiene sus raíces en los experimentos sobre la heterosis y su complemento endogamia realizada por Shull (1908, 1909). Observaron que cuando se autofecundaron plantas de maíz, su vigor y rendimiento de grano disminuye rápidamente. Sin embargo, cuando se cruzan dos líneas puras, tanto el vigor y rendimiento de grano de los híbridos F1 a menudo supera la media de los dos padres. Fue esta observación, hecha hace más de 90 años, y la metodología dispuesta por Shull (1909), que dio origen a la industria del maíz moderno (Crow, 1998).

Casi todos los campos de maíz cultivado en los países más desarrollados exhiben heterosis. Los híbridos de maíz modernos obtienen mayor rendimiento que los cultivares convencionales y además responden mejor a los fertilizantes.

Por lo tanto, la heterosis ha sido ampliamente estudiado en el maíz debido a: su gran expresión para la producción de grano (1-200 %), la explotación intensiva en la cría de híbridos de maíz, y los requisitos previos biológicas favorables como la gran coeficiente de multiplicación y facilidad tanto de uno mismo y controlado la fertilización cruzada.

La heterosis produce un estímulo general en la progenie o en el híbrido y afecta a las variedades de diferentes maneras. En general se manifiestan por:

- Mayor rendimiento de grano, forraje o frutos.
- Madurez más temprana.
- Mayor resistencia a plagas y enfermedades.
- Plantas más altas.
- Aumento en el tamaño o número de ciertas partes u órganos de la planta.
- Incremento de algunas características internas de la planta.

#### 2.4 Patrones heteróticos y grupos heteróticos.

Varios autores han definido el concepto de grupos heteróticos, como “el conjunto de genotipos relacionados o no genéticamente, que muestran similar habilidad combinatoria y respuesta heterótica cuando son cruzados con genotipos de otros grupos de germoplasma distinto”, por otra parte, un patrón heterótico, se refiere a un específico par de grupos heteróticos que expresan una alta heterosis y consecuentemente, sus cruzas forman híbridos de alta calidad. El concepto de patrón heterótico, incluye una subdivisión del germoplasma disponible en un programa de mejoramiento genético en al menos dos poblaciones divergentes que han sido mejoradas con métodos de selección interpoblacional. Los patrones heteróticos tienen un fuerte impacto en el mejoramiento genético de los cultivos puesto que pueden predeterminar el rumbo del mejoramiento a partir de germoplasma que puede ser utilizado en un programa en largos periodos de tiempo (Melchinger y Gumber, 1998; Melchinger, 1999; Reif y col., 2005; Fan y col., 2009).

#### 2.6 Caracterización de los recursos fitogenéticos

La caracterización del germoplasma, consiste en registrar aquellas características cualitativas y cuantitativas que son altamente heredables y que pueden ser fácilmente observadas, así como expresadas en la mayoría de los ambientes. Caracterizar, consiste en recabar datos para describir y diferenciar germoplasma.

Los descriptores para la caracterización deben reunir las siguientes condiciones: ser fácilmente observables, tener una alta acción discriminante y baja influencia ambiental, lo

que permite en algunos casos registrar la información en los sitios de colecta. La referencia utilizada para caracterizar genéticamente un material o un recurso fitogenético, son precisamente los llamados “marcadores genéticos”. Estos marcadores señalan las características de referencia mencionada anteriormente, como un instrumento en la caracterización. Así pues, un marcador, es una señal de la presencia de un gen, se utilizan características morfológicas, fenológicas y de adaptación, y en la actualidad marcadores bioquímicos y moleculares (Sosa, 2003).

Los primeros marcadores utilizados en estudios de caracterización y de genética de poblaciones fueron los marcadores morfológicos, los cuales identifican caracteres altamente heredables empleados en la determinación de frecuencias génicas, flujo y deriva génica y en la identidad de los individuos. Los marcadores morfológicos son una buena opción para los estudios de variación. En la actualidad existe una tendencia a utilizarlos junto con los marcadores moleculares, sin embargo, la correlación de los marcadores morfológicos con los moleculares no siempre es satisfactoria, ya que los primeros se ven afectados por múltiples factores y en la mayoría de los casos son el resultado de la expresión de más de un gen (Lewin, 2000; Infante y col., 2006), además de que pueden dirigirse a regiones que no determinan el fenotipo de los organismos.

En años pasados, los perfiles de proteínas y particularmente de enzimas fueron los caracteres preferidos, pero éstos han presentado dificultad técnica y han ido cayendo en desuso. Los marcadores químicos, basados en los perfiles de metabolitos secundarios, como los compuestos fenólicos, terpenos y compuestos nitrogenados y bioquímicos, basados en perfiles de proteínas, como las de almacenamiento y de enzimas, son marcadores que han sido usados con frecuencia debido a que su variabilidad es altamente heredable (Infante y col., 2006); sin embargo, los primeros pueden verse afectados por múltiples factores ambientales y fisiológicos de las poblaciones y los segundos pueden llegar a ser muy difíciles de interpretar (Harborne y Turner, 1984).

Los marcadores citogenéticos caracterizan a los individuos o grupos de individuos por su cariotipo, es decir el número y forma de sus cromosomas. La utilidad de estos caracteres para tipificar y delimitar grupos de individuos es limitada y difícil de aplicar a niveles inferiores al de especie (Infante y col., 2006). Actualmente se ha desarrollado una disciplina

llamada citogenética molecular que combina técnicas de citogenética clásica y de biología molecular que permiten tipificar a niveles infra específicos (Schwarzer y Helsop, 2000).

Los marcadores moleculares han sido ampliamente utilizados tanto para estudios filogenéticos y taxonómicos (Charles y col., 2002) como para estudios de variabilidad genética entre individuos y entre poblaciones (Clark y col., 2005). Un aspecto importante a tener en cuenta, es la selección del tipo de marcador que se empleará en cada caso. Dicha elección dependerá del objetivo del estudio que se pretenda abordar y de la biología de la especie. Sin embargo, no se puede olvidar que todas las técnicas moleculares presentan ventajas y limitaciones y su aplicación dependerá, en última instancia, de la disponibilidad de recursos para ejecutar un sistema de marcadores moleculares dado (Coto y Cornide, 2003).

Tapia (1998), menciona que la caracterización molecular, es decir, usando marcadores de ADN, posee ventajas como las siguientes: no es influenciada por el medio ambiente, es posible usar cualquier parte de la planta en cualquier estado de crecimiento, el número de análisis es ilimitado, se pueden utilizar pequeñas cantidades de material vegetal, el ADN es altamente estable con un elevado polimorfismo (número de alelos/locus) y los marcadores moleculares se distribuyen por todo el genoma.

El maíz, ha sufrido una evolución increíble desde su descubrimiento como planta autóctona en los altiplanos mexicanos, hasta nuestros días. En la actualidad, se cuenta con gran diversidad de razas, líneas puras e híbridos cuyas características genéticas específicas no se encuentran estudiadas del todo. CIMMYT (1988), manifiesta que los marcadores moleculares en la evaluación de germoplasma de maíz se usan para:

- Seleccionar un apropiado rango de diversidad dentro de un programa de mejoramiento, pues las colecciones más apropiadas pasan a ser incluidas en un programa de mejoramiento con características útiles que agronómicamente se encuentran dentro de un amplio rango de diversidad genética disponible. La información proveniente del análisis multivariado de marcadores moleculares podría suministrar un juego adicional de criterios para identificar colecciones que juntas representarían un rango amplio de diversidad.
- Identificar nuevas mezclas heteróticas, ya que en la producción de semillas híbridas de maíz es

extremadamente importante identificar combinaciones de germoplasma y organizar líneas y poblaciones dentro de grupos que demuestren similitud en la respuesta heterótica. • Elegir plantas testigo en el desarrollo de híbridos, ya que para obtener una colección útil y potencial para la producción de semillas de híbridos, es necesario medir la habilidad combinatoria de líneas de esa colección al cruzarla con genotipos genéticamente distintos. Para medir esta habilidad combinatoria se utilizarán testigos con genotipos diferentes a los de la colección. • Acelerar los programas de retrocruza, debido a que los marcadores moleculares pueden facilitar los programas de retrocruza fundamentalmente de dos formas. Primero, si un mínimo de introgresiones exóticas es requerido, el monitorear plantas individuales durante el programa de retrocruza de progenitores recurrentes que continúen en el programa reduciendo de esta manera el número de generaciones necesarias para la retrocruza. En segundo lugar, si es necesario integrar mayor cantidad de germoplasma exótico, los marcadores moleculares pueden ser empleados para monitorear la incorporación de alelos de padres donantes exóticos dentro del material adaptado, así, la única contribución del material exótico pueden ser mantenida durante la retrocruza.

Así pues, la aplicación de los marcadores de ADN a la evaluación de germoplasma, ha facilitado los trabajos de identificación de duplicados en los bancos, así como la clasificación de los materiales, el cálculo de la distancia genética entre accesiones, la identificación de su origen geográfico y la determinación de puntos de máxima variabilidad. Esta información facilita el manejo de las colecciones de germoplasma ya que permite tanto elegir plantas parentales para buscar nuevos alelos para ampliar la base genética de sus materiales y como una explotación más adecuada de la heterosis o vigor híbrido, que se refiere a la capacidad de éste para superar las características de sus padres (Lee, 1995; Avise, 2004).

Según Weising y col. (2005), uno de los objetivos primordiales por los que se generalizó el uso de los marcadores moleculares, es el mejoramiento y selección asistida por marcadores. La capacidad para poder detectar características genéticas particulares desde que el material se encuentra en la fase vegetativa o en banco de germoplasma, significa un ahorro importante de tiempo para el mejorador. Los marcadores que se encuentran ligados a

características agronómicas favorables o con potencial, serían los indicados para estos casos.

## 2.7 Marcadores moleculares ISTR y SSR

### 2.7.1 ISTR (Inverse Sequence Tagged Repeat)

Los elementos transponibles o mejor conocidos como elementos móviles (TEs) fueron descubiertos desde 1950, pero el significado y valor de este descubrimiento como fuente de variación genética en animales y plantas, se incubó durante los siguientes 30 años. Los elementos móviles o TEs, son secuencias de ADN que se mueven y replican dentro de los genomas, y es por esa razón que se les llama elementos móviles. En las plantas, como en otros organismos, se pueden encontrar diferentes tipos de TEs, pero los arreglos genómicos que modifican y las alteraciones estructurales y regulatorias de la expresión de genes individuales que ocasionan son muy variables (SanMiguel y Bennetzen, 1998).

Gran parte de la variabilidad genética de las plantas es explicada por eventos de movilidad de transposones y retrotransposones (Clark y Kidwell, 1997; Pearce y col., 1999), que provocan modificación y amplificación de secuencias o pérdida de las mismas por recombinación. Los elementos transponibles son segmentos de ADN con la habilidad para moverse entre los diferentes sitios de cromosoma y se mueve directamente el ADN en un “copiar y pegar” o “cortar y pegar”, Estos re-arreglos pueden formar nuevos genes, activar secuencias silenciosas o eliminar genes activos (Alberts y col., 1990).

Los retrotransposones son un tipo de elementos transponibles que desempeñan un papel importante en la constitución del genoma y en la evolución de genes en las plantas. Estos elementos pueden reubicarse a través de la transcripción inversa de un ARNm transcrito a partir del elemento móvil (SanMiguel y col., 1996; Young-An y Kong, 2003). Los retrotransposones se han encontrado en todo tipo de organismos, están en todas partes, dinámica y abundantemente en genomas de eucariotas (Sarilar y col., 2010; Malik y Eickbush, 2001). Se clasifican en dos grandes grupos, de larga repetición terminal (LTR) y retrotransposones no-LTR también conocidas como elementos de línea, sobre la base de sus estructuras generales.

Existen en la literatura, reportes de que al menos 65% del genoma del maíz está compuesto de retrotransposones LTR (Long Terminal Repeat), es decir retrotransposones que muestran secuencias terminales muy repetitivas (Meyers, y col., 2001; Whitelaw y col., 2003; Parveen y col., 2016). Los resultados de SanMiguel y Bennetzen (1998), indican que la diferencia entre el tamaño de los genomas del maíz y el sorgo, se debe principalmente al número de copias de secuencias de retrotransposones que posee el maíz, cuyo genoma reportaron con mediciones de citometría de flujo y tiene una dimensión en picogramos de 4.9 a 5.5, mientras que el sorgo es de entre 1.6 y 1.8 picogramos.

Los ISTR, pueden definirse como secuencias inversas, etiquetadas y repetidas y son marcadores moleculares basados en secuencias de retrotransposones que como se mencionó, existen en todos los organismos. Es una técnica basada en PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) que comprende la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de ADN en presencia de una enzima polimerasa. La reacción se basa en el apareamiento y la polimerización enzimática de un par de “primers” o iniciadores (pequeñas moléculas de ADN de cadena sencilla) que sirven como referencia para iniciar la reacción. Estos iniciadores son sintetizados artificialmente de modo que sean complementarios a las secuencias de la región “blanco”. Los pasos fundamentales de la PCR son: desnaturalización, apareamiento y polimerización de la cadena de ADN (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Parveen y col, 2016).

Los marcadores ISTR presentan una serie de ventajas con respecto a otros marcadores moleculares aleatorios y que los hace atractivos para la caracterización genética de las plantas y para estudios de variabilidad. Utilizan iniciadores universales, no es necesaria la visualización con radioactividad, amplifican un gran número de loci (5 a 100), detectan un polimorfismo considerable, son altamente reproducibles, no requieren gran cantidad ni alta calidad de ADN y se aplican a un amplio espectro de organismos (Lightbourn y Villeux, 2003). Uno de los primeros trabajos realizados con el marcador ISTR es el reportado por Rhode (1996) en cocotero. En ese estudio se ponen de manifiesto las ventajas de este marcador.

### 2.7.2 SSR (Short Sequence Repeats) o microsatélites

Los microsatélites, son secuencias de nucleótidos constituidas por la repetición en paquete o “tandem” de dos o más nucleótidos (usualmente no más de seis bases). Históricamente, se había comenzado a llamar microsatélite, sólo a las secuencias repetidas de las bases Citocina-Adenina con su correspondiente Guanina-timina, CA (GT). El término hoy en día, suele utilizarse para designar a cualquier repetición de bases con este tipo de secuencias (Goldstein y Schlötterer, 1999; Chistiakov y col., 2005).

Las formas más comunes de microsatélites, son dinucleótidos tales como (CA)<sub>n</sub>: (GT)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>: (CT)<sub>n</sub>, (CG)<sub>n</sub>: (GC)<sub>n</sub>, (AT)<sub>n</sub>: (TA)<sub>n</sub>, donde n es el número de repeticiones. En una serie en tandem, este número n es variable, pudiendo dar lugar a una gran cantidad de alelos para cada locus microsatélite en una población. Se trata de secuencias altamente variables, entre y dentro de individuos. La variación se manifiesta normalmente como diferencias en longitud entre los distintos alelos del mismo locus. Estas diferencias en longitud surgen de la existencia de un número diferente de repeticiones del motivo básico en cada caso. Se ha estimado que la tasa de mutación en los microsatélites varía entre  $10^{-2}$  y  $10^{-5}$  por generación y el mecanismo que explica mejor su alto grado de polimorfismo en tamaño es la acumulación de errores producidos por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN (Hedrick, 1999; Balloux y col., 2000; Balloux y Lugon Moulin, 2002; Parveen y col., 2016).

El uso de las secuencias microsatelites como marcadores genéticos se inicia con el desarrollo y generalización de la PCR. A pesar de que los microsatélites poseen altas tasas de mutación, las regiones flanqueantes están más conservadas y se emplean para la amplificación específica de los alelos de cada locus. Al final de los 80 es cuando se publican los primeros trabajos sobre el aislamiento y caracterización de microsatélites (Tautz, 1989). A partir de entonces su uso se ha difundido rápidamente, revolucionando los campos de la biología molecular, la genética cuantitativa y la genética de poblaciones. Los SSRs han sido durante muchos años los marcadores preferidos para múltiples objetivos, genética forense, pruebas de paternidad, análisis poblacionales, estudios de diversidad e identificación varietal, construcción de mapas genéticos y estudios de asociación (Balloux y Lugon- Moulin, 2002).

Los microsatélites reúnen una serie de características que los han convertido en marcadores de preferencia para el mapeo genético:

1) Son numerosos y se distribuyen ampliamente a lo largo de todos los genomas eucariotas (Wright, 1993, Hamada y col., 1982; Tautz y Renz, 1984; Echt y Nelson, 1997; Liu y Cordes, 2004). 2) Se heredan de modo mendeliano como marcadores codominantes, lo que facilita el seguimiento de su transmisión dentro de las poblaciones de mapeo (O'Connell y Wright, 1997). 3) La mayoría de los loci microsatélite tienen un tamaño relativamente pequeño que facilita su aplicación por vía PCR (Liu y Cordes, 2004). 4) Son potencialmente transferibles entre parientes y/o especies próximas (Young y col., 1998; Estoup y Angers, 1998), especialmente cuando el locus microsatélite se encuentra dentro de una secuencia génica (Pardo y col., 2005; Nagy y col., 2007).

Ésta última característica los hace especialmente útiles para estudios de genómica comparada, ya que convierte a los microsatélites en excelentes puntos de anclaje para identificar cromosomas homólogos entre especies relacionadas (Kondon y col., 1993; Crawford y col., 1995; McConnell y col., 2000; Sakamoto y col., 2000) o respecto a especies “modelo” bien conocidas a nivel genómico, como en el caso de *Arabidopsis thaliana* (Stemshorn y col., 2005; Franch y col., 2006).

Las ventajas que ofrecen los SSR se deben, en parte, al empleo de PCR con iniciadores largos, específicos de cada locus, ya que el tejido que se utiliza no necesita ser de mucha calidad, e incluso ADN en estado avanzado de degradación es suficiente para ser analizado. Su naturaleza codominante, que permite la distinción de homocigotos y heterocigotos, su amplia distribución en el genoma, su reproducibilidad y su elevada variabilidad (multialélicos) los han convertido en uno de los sistemas de marcadores genéticos más informativos y empleados. A pesar de que los SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) están reemplazando a los marcadores tipo SSR en estudios masivos, dado que pueden ser automatizados vía plataformas de genotipado de alto rendimiento, los microsatélites siguen siendo marcadores muy empleados, especialmente en estudios con un menor número de individuos (Ellegren, 2004).

En maíz, se han utilizado los microsatélites para estudios de similitud y relaciones genéticas entre líneas y entre especies. Senior y col. (1998) reportaron resultados para 94 líneas mejoradas usando 70 diferentes iniciadores para SSR. Estos investigadores coeficientes de similitud entre las líneas, al mismo tiempo que diversidad genética dentro de las líneas; de acuerdo al análisis que realizaron, se formaron nueve grupos, correspondientes según reportaron, a principales grupos heteróticos y a tipos de endospermo. En tiempos recientes, uno de los trabajos representativos del “caso maíz”, utilizó varias especies del género *Zea* para evaluar la utilidad de los microsatélites en el estudio de diversidad genética de ese género (Matzuoka y col., 2002). En el mencionado estudio, los autores utilizaron 59 microsatélites en poblaciones silvestres de *Zea diploperennis*, *Zea luxurians*, *Zea perennis* y *Zea mays* y encontraron que los SSRs son una poderosa herramienta en los estudios de filogenia, y de diversidad inter e intraespecífica.

## V OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general

Determinar mediante los marcadores SSR e ISTR, la pureza varietal de una línea de maíz multiplicada por autofecundaciones, realizar cruzas y detectar expresión heterótica en generaciones F1 y F2.

### 3.2 Objetivos específicos

- Realizar cruzas de los materiales LUG03, LUG282 y CML282 en campo y obtener una caracterización para rendimiento en F1 y F2.
- Generar patrones de bandeo específico con los marcadores ISTR y SSR de los padres y sus generaciones F1 y F2.
- Verificar si existe asociación entre las distancias genéticas estimadas con marcadores moleculares y la heterosis en F1 y F2.

### 3.3 Hipótesis

Es posible determinar la pureza varietal en líneas autofecundadas de maíz, utilizando marcadores moleculares ISTR y SSR y a su vez, detectar capacidad heterótica en la progenie F1 y F2.

## VI MATERIALES Y METODOS

### 4.1 Sitio de estudio

El estudio fue realizado en las instalaciones del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) en el Laboratorio de Marcadores Moleculares perteneciente al Instituto de Manejo y Aprovechamiento de los Recursos Fitogenéticos, Departamento de Producción Agrícola y en el campo experimental ubicado en Camino Ramón Padilla Sánchez #2100 Nextipac Zapopan, Jalisco, 20°44'48.6"N 103°30'44.9"W en los ciclos de invierno 2013-2014 y verano del 2014.

### 4.2 Material Biológico

#### 4.2.1 Pureza varietal

El material biológico utilizado para la prueba de pureza varietal, consistió en semilla de la línea CML282 proporcionada por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Esta línea fue derivada del Pool 22 (Tropical Intermediate Yellow Dent) y tiene como genealogía (G22F128\*G22F25)-2-2-3-1-BB-f. Esta línea es de grano amarillo semidentado con adaptación a los trópicos y subtrópicos y buena aptitud combinatoria general (CIMMYT, 1998). CML282 ha sido obtenida del CIMMYT en dos ocasiones por la Universidad de Guadalajara: a inicios de la década de 1990 y en el año 2010. En el primer caso fue avanzada y multiplicada por autofecundación para generar la línea LUG282 en dos versiones; la versión I fue obtenida por autofecundación durante alrededor de 10 generaciones, mientras que la versión II se autofecundó alrededor de ocho generaciones.

La línea LUG03 fue obtenida en el proyecto “obtención de poblaciones y líneas de maíz para el desarrollo de variedades mejoradas para el estado de Jalisco” que depende del Departamento de producción Agrícola del CUCBA. Fue derivada de generación avanzada del híbrido comercial H-357 liberado por el INIFAP en 1995 mediante autofecundación y selección de plantas individuales utilizando ciclos alternados en Ameca, Jalisco en siembras de verano y en Coquimatlán, Colima en siembras de invierno.

Con base en los marcadores SSR e ISTR se realizó una comparación de los patrones de bandeo generados con cada una de las versiones listadas anteriormente.

#### 4.2.2 Heterosis

Para hacer el estudio de expresión heterótica, se utilizaron las líneas CML282, LUG282 (I), LUG282 (II) mencionadas anteriormente. Adicionalmente se usó la línea LUG03 (I) y LUG03 (II), en total se consideraron cinco grupos de semilla como parentales adicionalmente se utilizaron las cruzas en F1. La siembra de plantas individuales de líneas parentales y F1 se realizó en charolas de unicel de 72 cavidades con peat moss (musgo descompuesto) del número 3, depositando una semilla por cavidad, a los 25 días después de la siembra se trasplantaron en invernadero, para obtención de tejido foliar que se usó para la extracción de ADN y de semilla para la obtención de las generaciones F2 mediante cruza fraternales. Las claves utilizadas para el material original y para sus cruza, se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Líneas y cruza utilizadas en el presente trabajo.

N° de materiales	Genealogia	Generación	Versión	Origen	N° de identificación
1	LUG03	Parental (P)	I	CUCBA 13-B	13876
2	LUG282	Parental (P)	I	CUCBA 13-B	13830
3	CML282	Parental (P)	I	CUCBA 13-B	13842
4	LUG03	Parental (P)	II	CUCBA 10-B	514
5	LUG282	Parental (P)	II	CUCBA 14-A	374
6	CML282xLUG282	F1	I	CUCBA 13-B	13830x13842
7	LUG282xLUG03	F1	II	CUCBA 12-B	737x759
8	LUG282xLUG03	F1	I	CUCBA 13-B	13830x13876
9	CML282xLUG03	F1	I	CUCBA 13-B	13876x13842
10	LUG282xLUG03	F2	I	CUCBA 14-B	13830x13876
11	CML282xLUG03	F2	I	CUCBA 14-B	13842x13876
12	LUG282xCML282	F2	I	CUCBA 14-B	13842x13830
13	LUG282xLUG03	F2	II	CUCBA 14-B	737x759

#### 4.2.3 Caracterización agronómica

Para la caracterización agronómica, durante el verano de 2014 y en condiciones de temporal se estableció un experimento en campo con base en un diseño experimental de Bloques Completos al Azar, utilizando tanto las líneas parentales, como las generaciones F1 y F2 listadas en el Cuadro 1. Se utilizaron para cada línea y cada cruza, cuatro surcos con 30 semillas sembradas y seis repeticiones por tratamiento.

Las variables agronómicas consideradas en este trabajo son:

- Número total de semillas germinadas a los 63 días de la siembra (EMR)
- Número total de plantas a los 65 días de la siembra (SOB)
- Días a floración Femenina y Masculina (FF y FM) (Días a floración masculina. Se contabilizó el número de días transcurrido desde la siembra hasta que el 50% de las plantas de la parcela útil estuvieron liberando polen.
- Floración femenina. Se contabilizó el número de días transcurridos desde la siembra hasta que el 50% de las plantas en la parcela total expusieron sus estigmas (aproximadamente 3 cm) en el jilote principal.
- Altura de planta (AP)- Se midió la altura de cinco plantas, en centímetros, midiendo desde el ras del suelo hasta la punta de la espiga.
- Altura de mazorca (AM). Se midió la altura de cinco plantas en centímetros, midiendo desde el ras del suelo hasta el nudo donde se inserta la mazorca principal, se tomaron las mismas plantas del dato anterior.
- Número de plantas cosechadas (PC)
- Número de mazorcas cosechadas (MXP)
- Número de plantas dañadas (PD). Se realizó una calificación visual con una escala de 1 a 9 donde 1 fue para plantas indeseables y 9 para plantas con potencial para ser sembrado por los agricultores.
- Calificación de mazorca (CM). Se les dio una calificación de 1 a 9 en donde 1 se usó para aquellas mazorcas que tenían malas características de grano como mazorcas chicas, variables con pudriciones de grano y/o poco peso y 9 para aquellas que tenían las mejores características
- Peso de grano (RENDG). Se desgranaron las mazorcas cosechadas por parcela y se registró el peso de grano.
- Humedad del grano (H)
- Volumen con respecto al peso (V). El rendimiento por ha se calculó restando 100 a la humedad del grano obtenido, esto dividido entre 100 y el producto se multiplico por el peso de grano multiplicado por 10 y dividido entre la parcela útil cosechada.

#### 4.2.4 Prácticas agronómicas realizadas

La preparación del suelo consistió en barbecho y dos pasos de rastra, la siembra se realizó en suelo húmedo con sembradora experimental de 4 surcos, depositando 30 semillas por surco de 4 m y distancia entre surcos de 0.80 m. Se aplicaron 200 kg/ha con la fórmula de fertilización 18-46-00, 20 kg/ha de insecticida granulado clorpirifos al 5% para el control de plagas del suelo. la emergencia en general fue buena y a los 25 días después de la siembra se realizó el aclareo de plantas dejando una población de 65, 000 plantas/ha. Se realizó una segunda fertilización con urea (250 kg/ha) manualmente. Se realizaron dos aplicaciones de insecticida foliar Lorsban 480 E (clorpirifos) a una dosis de 0.5 L/ha. A los 50 días se hizo una aplicación de Convey (topramezone al 33.6%), herbicida selectivo a maíz para el control de zacates y hojas anchas, con 1kg de atrazina además de un adherente para el control de malezas en la etapa final del cultivo.

#### 4.3 Extracción de ADN

Para la aplicación de marcadores moleculares, se utilizó tejido foliar de una muestra variable de individuos, dependiendo de la disponibilidad en campo. Para LUG03 I y CML282 fue de 14 individuos, para LUG282 I, 12 individuos; para LUG03 II y LUG282 II, 24 individuos y para las cruza entre líneas, fue de 30 individuos, lo cual representó un total de 328 individuos. La extracción de ADN se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Saghai-Marroof y col. (1984). Este protocolo consiste en moler 0.35 g de material fresco con nitrógeno líquido y homogeneizar el polvo obtenido con amortiguador de extracción 2X CTAB (Tris-HCl 100mM (pH 7.5), NaCl 5M, EDTA 20mM, CTAB 2%,  $\beta$ -mercaptoethanol 1% y bisulfito de sodio 1%). Se incubó en baño maría a 60°C durante 30 min. y se añade cloroformo:octanol. Se precipita el ADN con etanol. En el paso final se resuspende el ADN en T.E. (Tris 10mM- EDTA 1mM) hasta su utilización en PCR.

La calidad y la concentración del ADN extraída, se verificó de acuerdo a protocolos de espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa 1% (Sambrook y Russell, 2001).

Se utilizaron los marcadores moleculares SSR e ISTR para realizar la comparación de los patrones de amplificación de los padres y su generación F1 y F2.

#### 4.4 SSR (Microsatélites)

Se utilizaron diez iniciadores para SSR con ubicación en cada uno de los cromosomas del maíz. Las características de éstos se presentan en la Cuadro 2.

Cuadro 2. Ubicación de los iniciadores para SSR de maíz, e información complementaria para su aplicación en PCR

Iniciador	*P	**S	***T	Sentido	Antisentido
phi120	1.11	AAG	60.3°C	GACTCTCACGGCGAGGTATGA	TGATGTCCCAGCTCTGAACTGAC
phi96100	2.01	ACCT	57.2°C	AGGAGGACCCCAACTCCTG	TTGCACGAGCCATCGTAT
phi099	3.04	AC	60.1°C	TACAAAAATCAGGACTGCGAAAAACCCAA	GTCGGTGTGTGATCCTTCCAC
phi076	4.11	AGCGGG	60°C	TTCTCCGCGGCTTCAATTTGACC	GCATCAGGACCCGAGAGTC
phi109188	5.03	AAAG	54°C	AAGCTCAGAAGCCGGAGC	GGTCATCAAGCTCTCTGATCG
phi159819	6.08	---	56°C	GATGGGCCCTAGACCAGCTT	GCCTCTCCCATCTCT
phi034	7.02	CCT	56°C	TAGCGACAGGATGGCCTCTTCT	GGGGAGCACGCCTTCGTTCT
phi121	8.03	CCG	59°C	AGGAAAATGGAGCCGGTGAACCA	TTGGTCTGGACCAAGCACATACAC
phi032	9.04	---	56°C	CTCCAGCAAGTGATGCGTGAC	GACACCCGGATCAATGATGGAAC
phi96342	10.02	ATCC	59°C	GTAATCCCACGCTCTATCAGCC	TCCAACCTGAACGAACTCCTC

\*P= Cromosoma y Bin \*\*S= Microsatélite detectado \*\*\*T =Temperatura de alineación

La PCR para este marcador se realizó con una mezcla de reacción con la siguiente composición: amortiguador PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM y Taq pol. 0.025U, en volumen final de 20 µL.

La amplificación se realizó con el siguiente programa: 35 ciclos en una temperatura de desnaturalización de 94°C durante 1 min, la temperatura de alineación fue variante dependiendo de cada iniciador (Cuadro2) y se aplicó por 1 min, 72°C durante 1 minuto y al final de los ciclos se terminó con 5 min a 72 °C para extensión final y se mantuvo a 4°C.

La resolución de los productos de amplificación para el marcador SSR fue hecha en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 6%, que se tiñeron de acuerdo a protocolos convencionales de sales de plata (Sambrook y Russel, 2001).

#### 4.5 ISTR

Para el caso de los ISTR, se probaron tres combinaciones de iniciadores cuyas secuencias se presentan en el Cuadro 3.

La PCR se llevó a cabo en una mezcla de reacción con la siguiente composición:

Amortiguador PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> 3mM, dNTPs 0.25 mM, Taq pol. 0.025, en un volumen final de 20 µL.

La amplificación se realizó con el siguiente programa: 40 ciclos que en cada iniciador consistió en una temperatura de desnaturalización de 95 °C durante 3 min 30 s, la temperatura de alineación que se utilizó, fue de 45°C durante 1 min, 72°C durante 2 min y al final de los ciclos se adicionaron 10 min a 72 °C para extensión final y una temperatura de conservación de 4°C.

Cuadro 3. Secuencias de los iniciadores para el marcador ISTR utilizados en el presente trabajo.

Iniciadores ISTR (Sentido)	Secuencia de 5' a 3'
F31	GTCGACATGCCATCTTTC
F61	ATATATGGACTTAAGCAAGCA
F31	GTCGACATGCCATCTTTC
B31	ATTCCCATCTGCACCAAT
B81	CCTCCTTATTGGGAATGATAT
B1	ATCAGGAAGGTCTGTAAAGC

La resolución de los fragmentos del marcador ISTR se realizó en geles de agarosa de alta resolución a concentraciones de 1.5% y se tiñeron con bromuro de etidio, según protocolos convencionales (Sambrook y Russel, 2001).

#### 4.6 Análisis de datos

##### 4.6.1 Pureza varietal

Para la determinación de la pureza varietal, se utilizaron las matrices de datos generadas por los marcadores moleculares. Con los ISTRs se obtuvieron matrices binarias de presencia/ausencia y con los SSR, se generaron matrices de peso molecular. Con ambas matrices se obtuvieron datos de frecuencias génicas utilizando los programas Excel y Convert versión 1.31 (Glaubitz, 2005) y posteriormente se calcularon las matrices de distancias genéticas, usando el método de promedio de distancias taxonómicas, utilizando

$$E_{ij} = \sqrt{\sum_k (X_{ki} - X_{kj})^2}$$

y análisis de agrupamiento UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic averages) con el programa NTSYS versión 2.1 (Rohlf, 2009). Los resultados se presentan en dendrogramas y cuadros de distancias, con los cuales se realizaron comparaciones de acuerdo a las siguientes claves:

Cuadro 4. Clave para la comparación de distancias genéticas entre los materiales utilizados.

Clave	Comparación
d <sub>1</sub>	<i>Fi</i> vs SSR
d <sub>2</sub>	<i>Fi</i> vs ISTR
d <sub>3</sub>	<i>Fi</i> vs datos agronómicos

Donde *Fi* representa a la progenie F1 o F2.

Los resultados se muestran en cuadros comparativos

#### 4.6.2 Análisis de las variables agronómicas

Para el análisis de las diferencias entre datos agronómicos, se realizaron análisis de varianza de todas las variables medidas y una comparación múltiple de medias por la prueba de Tukey.

#### 4.6.3 Heterosis

Para evaluar la capacidad heterótica, se utilizaron los datos de rendimiento de todos los materiales. Se hicieron las comparaciones entre la progenie y las líneas progenitoras utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Heterosis (H}_1\text{)} = \frac{Fi - \text{Valor del mejor padre}}{\text{Valor del mejor padre}} \times 100$$

$$\text{Heterosis(H}_2\text{)} = \frac{Fi - \text{Promedio de los padres } (P_1 + P_2)/2}{\text{Promedio de los padres } (P_1 + P_2)/2} \times 100$$

Donde  $F_i$  representa a la progenie F1 o F2.

Se calculó la reducción de la heterosis en F2 con respecto a la progenie F1, utilizando la siguiente fórmula.

$$\text{Heterosis (H}_3\text{)} = \frac{F1-F2}{F2} \times 100$$

#### 4.6.4 Comparación entre matrices

Se realizó un análisis de correspondencia de matrices de similitud, basado en la prueba de Mantel con los datos obtenidos de los marcadores moleculares ISTR y SSR y los datos agronómicos. Esta prueba evalúa la correlación entre las matrices de distancia; la significancia estadística de esta asociación se mide por un procedimiento de asignación al azar en la que el orden de los elementos en una de estas matrices son permutados (Manly, 1997).

Las pruebas de correspondencia entre las diferentes matrices se realizaron sobre la base de 1,000 repeticiones al azar, utilizando el módulo de MXCOMP del software NTSYS versión 2.21 (Rohlf, 2009).

## VII RESULTADOS

### 5.1 SSR (Microsatélites)

Para obtener los genotipos con cada SSR, fue necesario realizar 17 geles para cada iniciador. En la Figura 1, se muestran como ejemplo los patrones de amplificación de los fragmentos separados por electroforesis en geles de poliacrilamida del iniciador phi076 de la línea LUG03 y LUG282 de la versión II. En el primer gel se muestran los padres, (Los 5 primeros individuos son LUG03 versión II y los siguientes 14 individuos son LUG282 versión II) en el segundo, la generación F1 y en el tercero la generación F2. Para el ejemplo con este iniciador, La banda obtenida para los progenitores, fue de 178 a 156 pb, mientras que para F1 y F2 fue de 166 a 164 pb. El tamaño de los fragmentos obtenidos, corresponde a lo esperado para cada iniciador (Maize GDB, 2012). Se realizó una matriz con los datos de peso molecular de cada alelo para todos los iniciadores usados en este marcador.

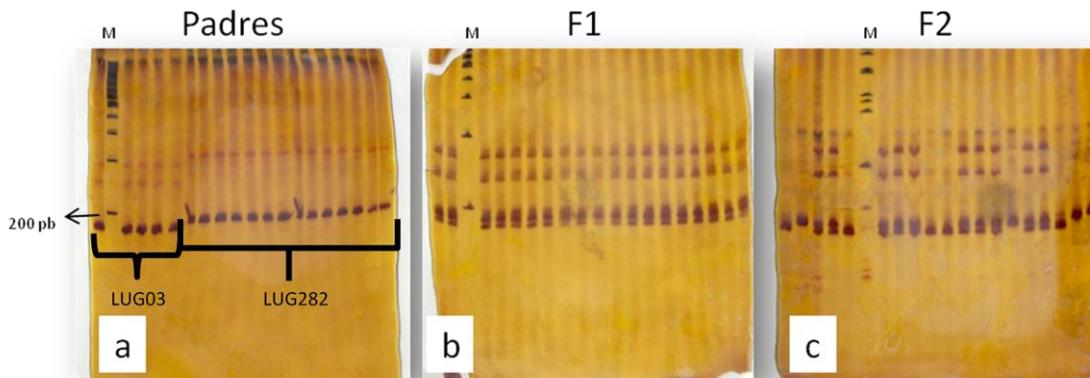


Figura 1. Patrón de amplificación para el iniciador phi076 de SSR en maíz. a) Padres LUG03 y LUG282 de la versión II; b) Generación F1 de la cruce LUG03xLUG282 versión II; c) Generación F2 de la cruce LUG03xLUG282 versión II. M= marcador de peso molecular 100 pb.

### 5.2 ISTR

Para la separación de los fragmentos obtenidos con el marcador ISTR se analizaron nueve geles de agarosa por cada iniciador. En la Figura 2, se muestra un ejemplo de amplificación

para este marcador, usando la combinación F31-B1. En esta figura se encuentran representados los individuos de las cruzas CML282xLUG282 versión I y LUG03xLUG282 versión II de la generación F2. Se trata de cruzas con individuos que no son genéticamente iguales, sin embargo, los patrones de amplificación muestran loci comunes en todos los individuos o en la mayoría de ellos, los cuales están marcados con flechas en la Figura.

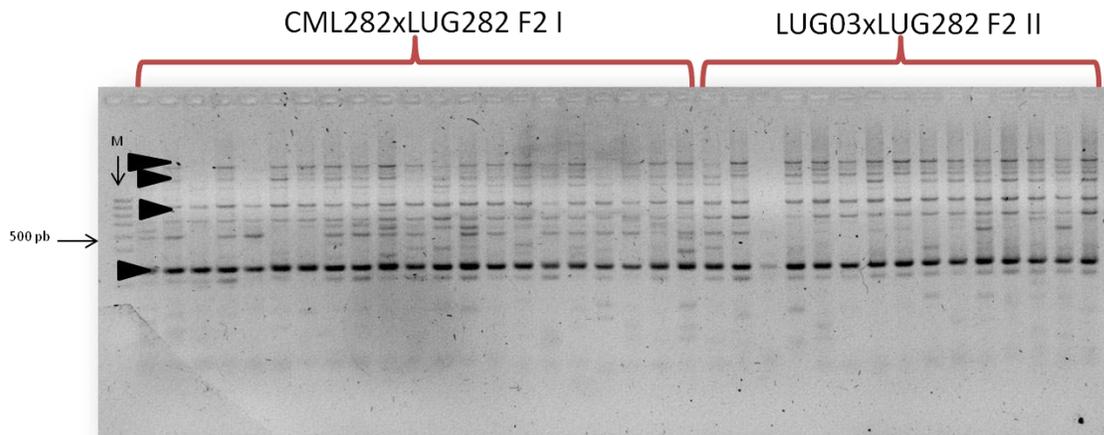


Figura 2. Patrón de amplificación para la combinación F31-B1 de ISTR. M= marcador de peso molecular 100 pb.

### 5.3 Datos Agronómicos

Para la obtención de los datos agronómicos se tomaron datos cuantitativos de algunas características de los padres y de cada generación. Con los datos se realizó una matriz de promedios para cada variable.

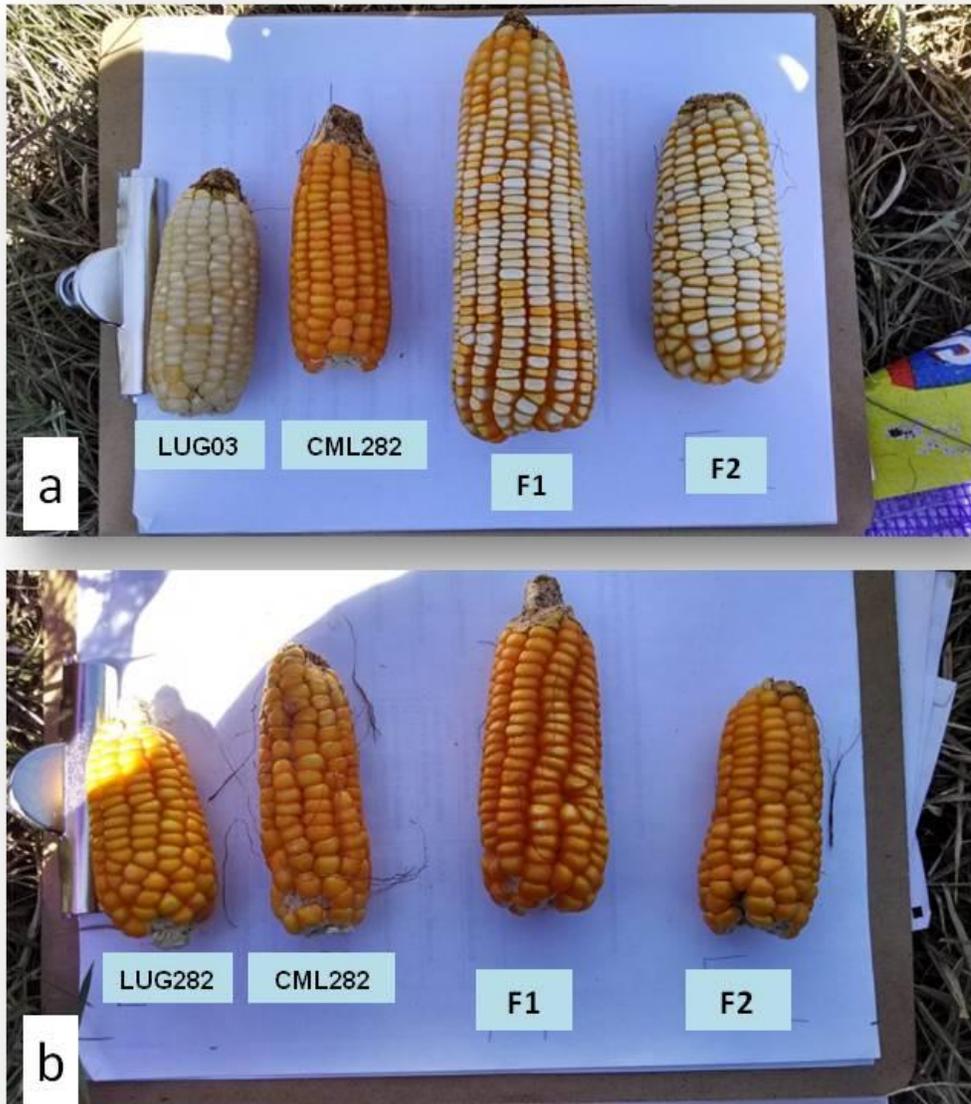


Figura 3. Mazorcas cosechadas en el diseño experimental en campo. a) Padres, generación F1 y F2 de LUG03 y CML282 de la versión I; b) Padres, generación F1 y F2 de LUG282 y CML282 de la versión I.

#### 5.4 Pureza varietal

Para el caso del presente trabajo, se produjeron datos desde tres puntos de vista, como se mencionó anteriormente, con dos marcadores moleculares (SSR e ISTR) y con datos agronómicos (morfológicos). Con las matrices producidas con cada marcador, se obtuvieron datos para distancia genética. Los siguientes dendrogramas representan las semejanzas y diferencias encontradas con base en cada marcador.

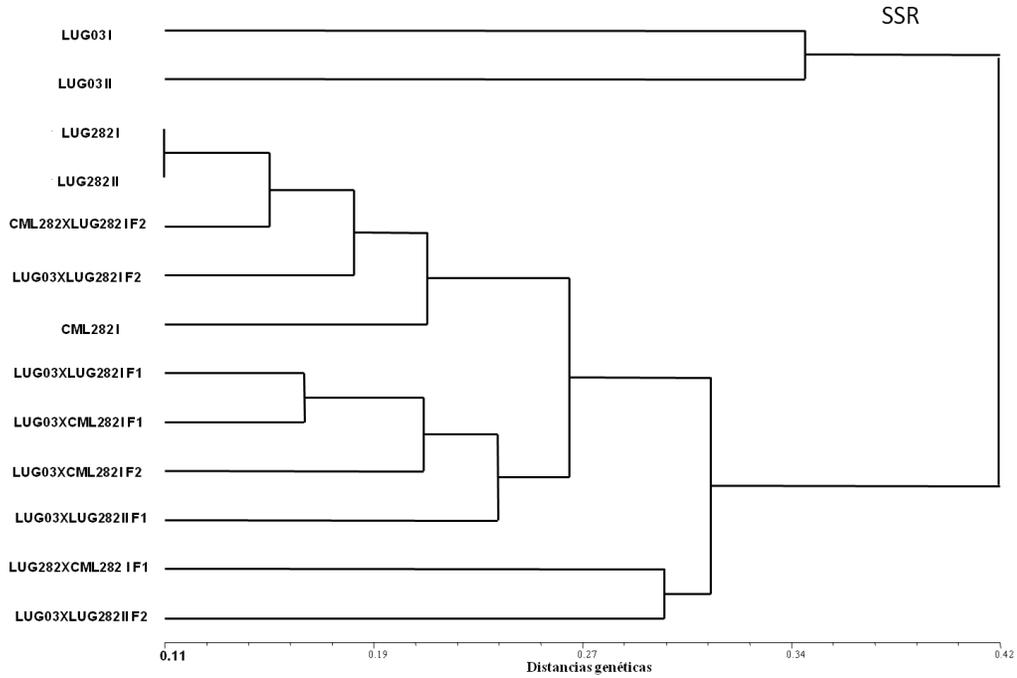


Figura 4. Dendrograma de asociación de parentales, F1 y F2 de maíz, producido por datos generados con SSR.

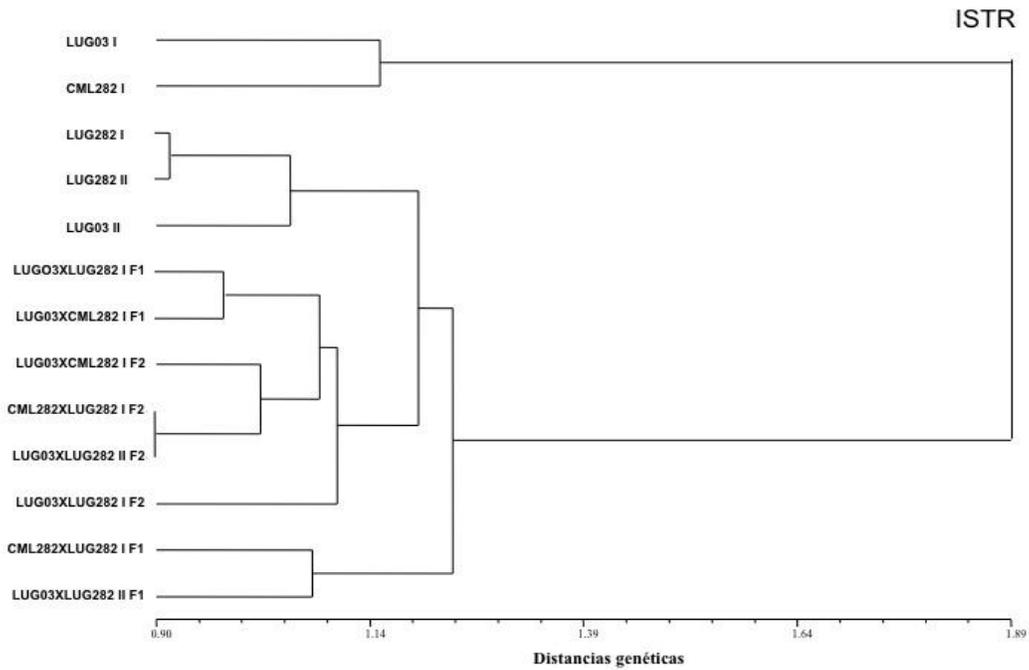


Figura 5. Dendrograma de asociación de parentales, F1 y F2 de maíz, producido por datos generados con ISTR

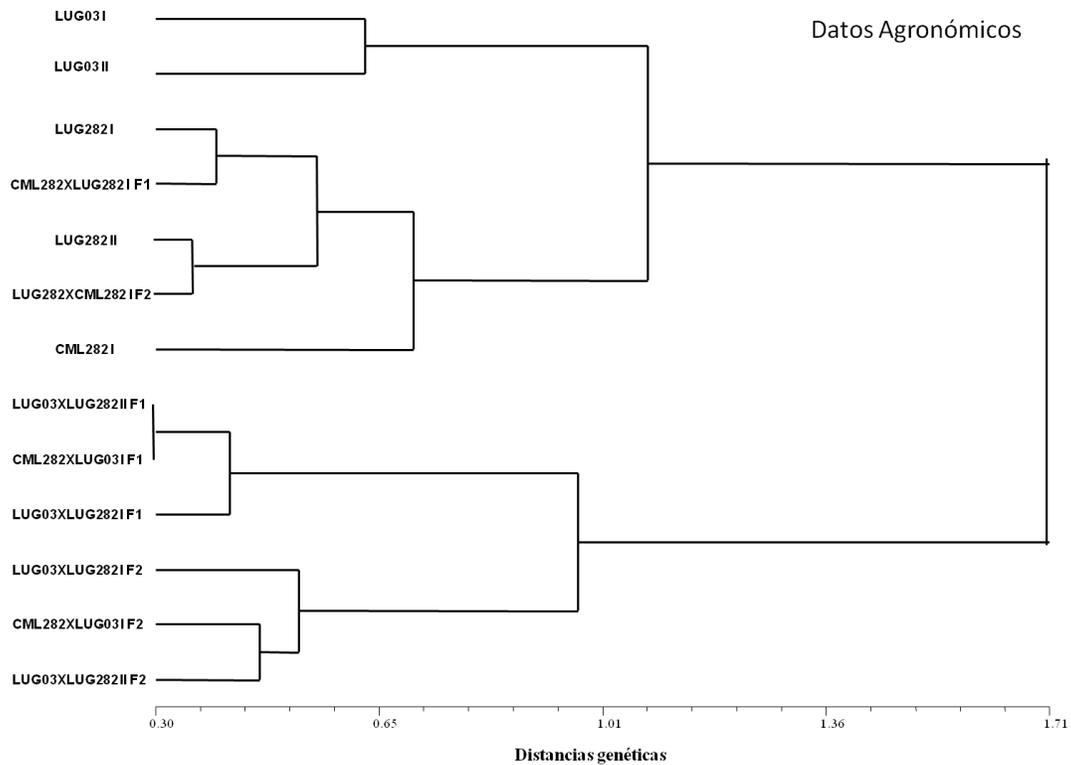


Figura 6. Dendrograma de asociación de parentales, F1 y F2 de maíz, producido por datos generados con datos agronómicos

Las asociaciones encontradas para cada marcador molecular, representan la parte del genoma que se detecta con cada marcador específico. Las dos versiones de la línea LUG03 obtuvieron un coeficiente de distancia bajo, lo cual indica su similitud genética, detectada con un valor de 0.347 con SSR, 0.6306 con morfología y en cuanto al marcador ISTR reportó un valor de 1.9774 que indica menor similitud. En cuanto a los datos generados con ISTR, se puede observar en la Figura 5, que no existió una separación entre los materiales de la generación F1 de los de F2, cabe mencionar que la distancia genética entre LUG282 en las dos versiones fue de 0.9146 lo que representa la menor distancia genética entre los materiales analizados con este marcador y superada solo por el valor de 0.897 entre las cruza LUG03XLUG282 II F2 y CML282XLUG282 I F2.

En la Figura 6, se observa que la separación de los materiales corresponde a dos grandes grupos en donde los padres están asociados al primero.

## 5.5 Análisis de las variables agronómicas

Cuadro 5. Promedios de las variables medidas

MATERIALES	RENDG	EMR	SOB	FM	FF	AM	AP	PC	Mxp	CM	V
LUG03 I	970	59	99	75	77	0.56	1.18	33	0.84	8.83	68
LUG282 I	877	55	95	75	76	0.61	1.51	32	0.78	7.17	56
CML282 I	1151	52	93	76	77	0.66	1.43	29	0.87	7.83	63
LUG03 II	1356	63	97	73	76	0.6	1.24	36	0.91	9.33	64
LUG282 II	821	53	96	76	78	0.58	1.39	32	0.8	7.17	63
LUG282xCML282 F1 I	939	56	92	74	77	0.63	1.47	35	0.72	7	60
LUG03xLUG282 F1 II	5915	67	96	72	73	1.04	2.07	39	1.01	9.83	64
LUG282xLUG03 F1 I	5690	74	87	72	73	1	1.98	40	0.95	9.67	69
LUG03xCML282 F1 I	5426	69	93	72	73	1.06	2.03	37	0.98	9.83	67
LUG282xLUG03 F2 I	2503	63	97	72	74	0.73	1.6	35	0.99	8.83	70
CML282xLUG03 F2 I	2770	72	88	72	73	0.82	1.72	38	0.91	8.67	72
CML282xLUG282 F2 I	1030	57	97	75	77	0.59	1.46	35	0.76	7.17	63
LUG03xLUG282 F2 II	2735	70	92	73	75	0.86	1.71	38	0.97	8.5	69
GL	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
SS	2.76E+08	4007.283	941.695	168.8718	250.7949	2.452578	5.99935	744.128	0.67978	83.1282	1434.77
MS	23024681	333.9402	78.47458	14.07265	20.89957	0.204381	0.499946	62.0107	0.05665	6.92735	119.564
valor F	53.37	2.9	1.1	5.75	7.47	38.58	72.83	2.02	6.43	19.07	2.14
valor P	<.0001	0.0032	0.3807	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0378	<.0001	<.0001	0.0274
Medias	2475**	62*	94 <sub>ns</sub>	73**	75**	0.75**	1.60**	35*	0.88**	8.45**	65*
CV	26.53	17.2	9.01	2.13	2.22	9.72	5.17	15.7	10.61	7.133	11.45
TUKEY	1501.56	24.5	19.3	3.57	3.82	0.166	0.189	12.66	0.214	1.377	17.1

\*, \*\* = Significativo a 0.05 y 0.01 nivel de probabilidad respectivamente. RENDG: rendimiento en grano; EMR: semillas germinadas; SOB: plantas que sobrevivieron; FM: floración masculina; FF: floración femenina; AM: altura de mazorca; AP: altura de planta; PC: plantas cosechadas; Mxp: mazorcas cosechadas; CM: calificación de mazorca; V: volumen de grano. SS: Suma de cuadrados; MS: Cuadrado medio; GL: grados libertad. CV: coeficiente de variación.

La principal variable de comparación entre los materiales estudiados, fue el rendimiento. Las líneas y cruza con menor rendimiento se separaron en el dendrograma producido por la matriz de distancias con datos agronómicos. El mayor de rendimiento fue para la cruza F1 de LUG282 X LUG03 de la versión II.

Todas las variables para este experimento, fueron significativas o altamente significativas, a excepción del número total de plantas a los 65 días de comenzado el experimento en campo.

## 5.6 Heterosis

Cuadro 6. Heterosis para el rendimiento de grano y altura de planta entre líneas e híbridos.

MATERIALES	RENDG	P1	P2	H1	H2	H3	MATERIALES	AP	P1	P2	H1	H2	H3
LUG282xCML282 F1 I	939	1151	1014	1.76	4.39	-8.11	LUG282xCML282 F1 I	0.63	0.61	0.66	5.30	1.67	6.59
LUG03xLUG282 F1 II	5915	1356	1088.5	5.71	15.07	129.81	LUG03xLUG282 F1 II	1.04	0.60	0.58	73.31	76.64	20.56
LUG282xLUG03 F1 I	5690	970	923.5	24.82	29.37	145.09	LUG282xLUG03 F1 I	1.00	0.61	0.56	61.95	69.58	36.11
LUG03XCML282 F1 I	5426	1151	1060.5	15.93	23.13	103.83	LUG03XCML282 F1 I	1.06	0.56	0.66	59.03	72.60	29.07
LUG282xLUG03 F2 I	2503	970	923.5	7.03	10.92	-	LUG282xLUG03 F2 I	0.73	0.61	0.56	18.99	24.60	-
CML282xLUG03 F2 I	2770	1151	1060.5	20.84	28.36	-	CML282xLUG03 F2 I	0.82	0.56	0.66	23.21	33.72	-
CML282xLUG282 F2 I	1030	1151	1014	2.77	5.43	-	CML282xLUG282 F2 I	0.59	0.61	0.66	11.15	7.75	-
LUG03xLUG282 F2 II	2735	1356	1088.5	10.99	20.81	-	LUG03xLUG282 F2 II	0.86	0.60	0.58	43.76	46.52	-

RENDG= rendimiento, AP= Altura de planta; P1 y P2= Padres; H1 (Heterosis con respecto al mejor padre), H2 (Heterosis con respecto al promedio) y H3 (Heterosis en F2 con respecto a F1).

Cuadro 7. Distancias genética entre líneas e híbridos.

MATERIALES	d1	d2	d3
LUG282xCML282 F1 I	0.338	1.8861	0.8647
LUG03xLUG282 F1 II	0.412	1.3774	1.5178
LUG282xLUG03 F1 I	0.418	2.0794	1.9279
LUG03XCML282 F1 I	0.300	1.853	2.1454
LUG282xLUG03 F2 I	0.495	1.9935	0.9824
CML282xLUG03 F2 I	0.318	1.6684	1.7843
CML282xLUG282 F2 I	0.165	1.7063	0.7019
LUG03xLUG282 F2 II	0.474	0.9380	0.9523

d1 (distancias calculadas con SSR), d2 (Distancias calculadas con ISTR) y d3 (distancias calculadas con datos agronómicos).

Las cruzas que produjeron mayor rendimiento, fueron las realizadas entre LUG282 y LUG03 en las dos versiones comparadas. Sin embargo, al analizar los datos de heterosis, se encuentra un contraste entre la craza realizada con los maíces de la versión I con los de la versión II, siendo ligeramente más rendidores los de la versión II. Para altura de planta se encontró que las mismas cruzas que mostraron mayor heterosis en rendimiento, fueron las que mostraron mayor altura. La distancia genética que se encontró para esta craza, difiere según el marcador de referencia, por ejemplo, para distancias producidas por SSRs el valor fue  $d1=0.412$ , para ISTRs  $d2= 1.3774$  y para datos agronómicos  $d3= 1.5178$ . La menor distancia genética se detectó fue con el marcador SSR en la craza CML282 x LUG282 en

F2 con 0.165 y la mayor distancia detectada fue en los marcadores ISTR en la cruza LUG282 x LUG03 F1 de la versión I con 2.0794.

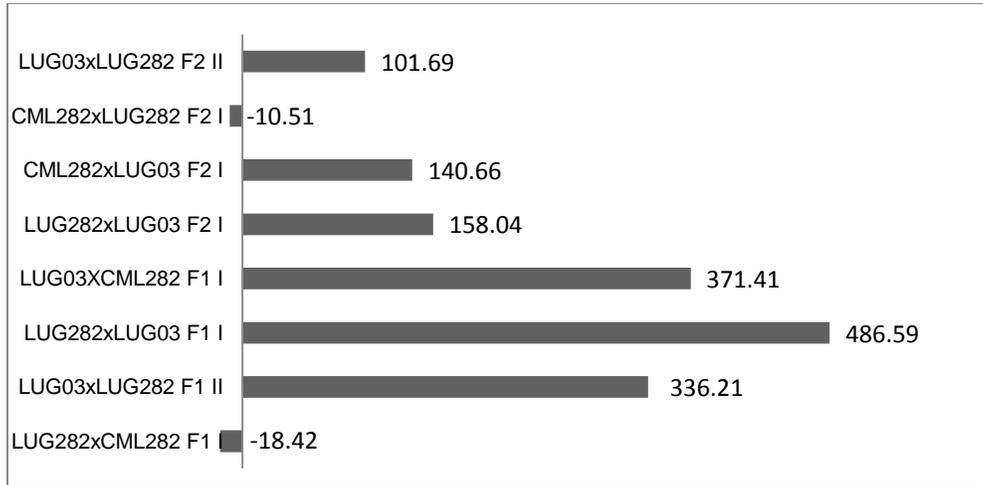


Figura 7. Heterosis con respecto al valor del mejor padre

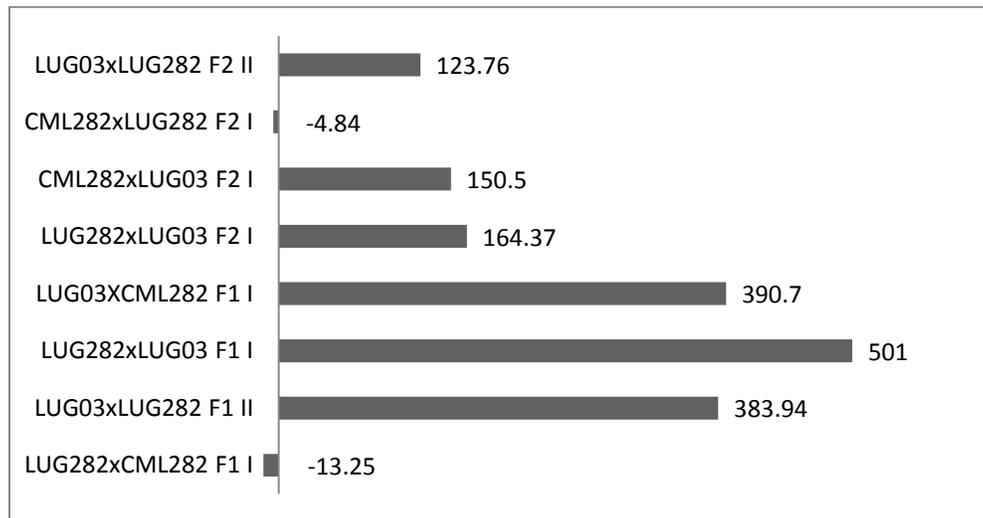


Figura 8. Heterosis con respecto al promedio de los padres

En las Figuras 7 y 8, se presentan las diferencias de heterosis entre la cruza LUG282 X LUG03 en F1, que fue de 336.21 de la versión II con respecto al padre con mayor rendimiento y de 486.59 de la versión I con respecto al padre con mayor rendimiento. En la

comparación entre el rendimiento de esa cruce y el promedio de los padres, la diferencia fue menor, ya que se encontró una heterosis de 383.94 en la versión II y 501 en la versión I.

### 5.7 Comparación entre las versiones

Con los valores de distancias genéticas, se realizaron comparaciones entre las líneas utilizadas, que se presentan en las figuras 9 a 11.

Al comparar las versiones de la línea LUG282 con la CML282, se encontraron diferencias entre ellas, con respecto a los marcadores SSR y datos agronómicos y distancias similares con respecto al marcador ISTR (Figura 9). Lo anterior puede ser debido a que las dos versiones de la línea LUG282 estuvieron sujetas a avance en endogamia y selección en el CUCBA por 8 a 10 generaciones

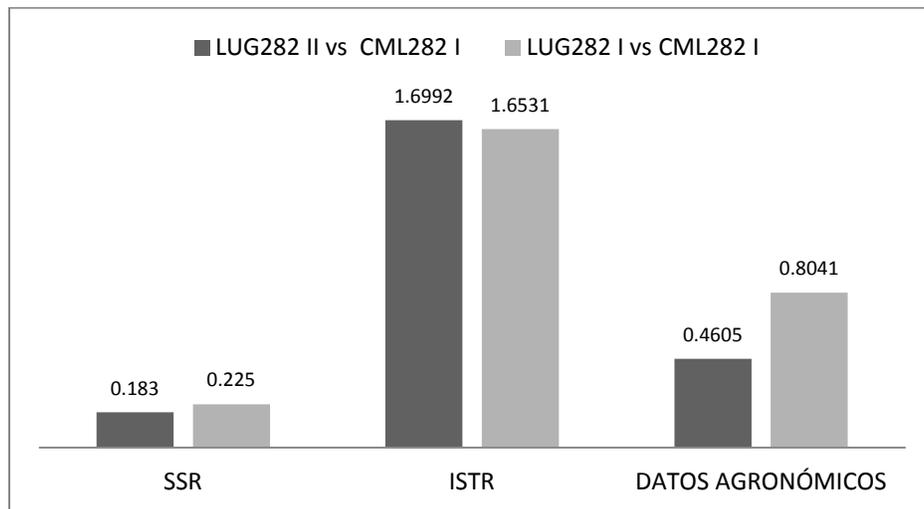


Figura 9. Comparación entre los materiales parentales

En cuanto a la comparación entre los dos materiales LUG, se encontró diferencia con respecto a la distancia genética entre ellas, detectada con los tres marcadores (Figura 10).

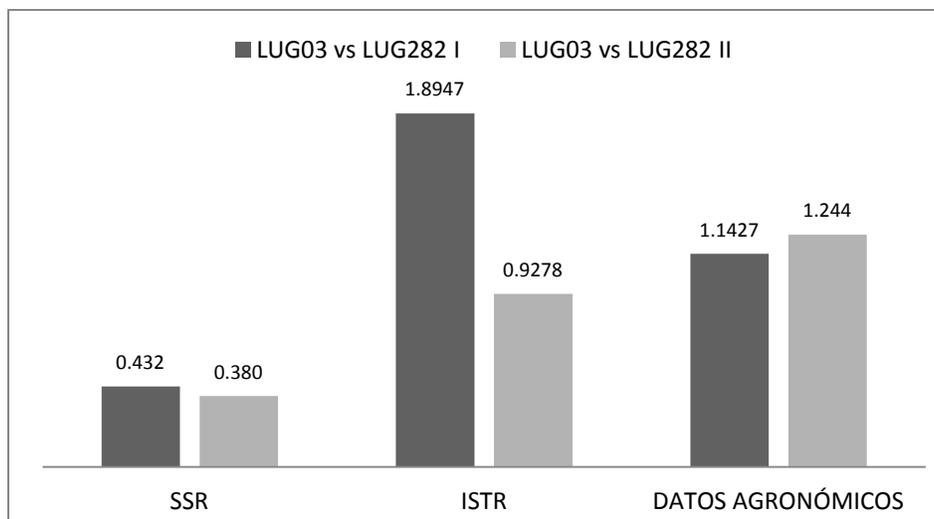


Figura 10. Comparación entre los materiales LUG03 y LUG282 en sus dos versiones.

En cuanto a la comparación entre los dos materiales LUG, se encontró diferencia con respecto a la distancia genética entre ellas, detectada con los tres marcadores (Figura 11).

Con respecto a las versiones I y II de las cruzas entre LUG282 y LUG03, se obtuvo un valor de referencia, basado en las diferencias entre las distancias que pudieron encontrarse en los individuos evaluados. El resultado encontrado fue de diferencias del orden de 0.104 (distancia genética) con SSR, de 0.9669 con ISTR y de 0.1013 con datos agronómicos.

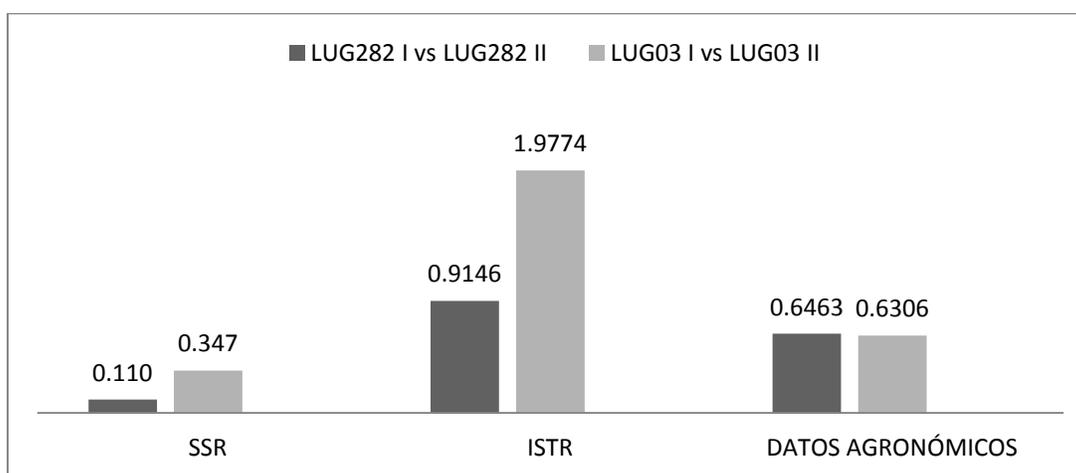


Figura 11. Comparación entre los materiales LUG entre sí en sus dos versiones.

### 5.8 Comparación entre matrices

Con el fin de determinar la correlación entre las matrices producidas con distancia genética de los datos moleculares y agronómicos, se llevo a cabo la prueba de Mantel para obtener el grado de relación entre ellas. Esta prueba evalúa la correlación entre las matrices de distancias genéticas. Los resultados de la correlación con respecto a las matrices se presentan en el Cuadro 8. Se encontraron bajos valores de significancia, es decir, valores de  $r$  que fluctúan entre 0.36 y 0.15. El valor más alto se encuentra entre el marcador ISTR vs SSR.

Cuadro 8. Correlación de las matrices de similitud derivadas de marcadores moleculares ISTR, SSR y datos agronómicos.

	ISTR	SSR	DATOS AGRONÓMICOS
ISTR	1		
SSR	0.36999	1	
DATOS AGRONÓMICOS	0.19243	-0.15153	1

## VIII DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, con respecto a la pureza varietal, confirman el hecho ya muy discutido de que cuando en el proceso reproductivo, la meiosis está implicada, existe la recombinación y la progenie no es idéntica a sus padres, lo cual se refleja en las diferencias entre la línea CML282 y la LUG282 que fue obtenida a partir de por lo menos ocho fecundaciones, lo cual fue reportado por Rodríguez (2013). En ese trabajo, se reporta que la línea CML282 parece haber tenido suficiente variación genética, al grado de que las dos versiones obtenidas por autofecundación por más de ocho generaciones, difirieron de ella, lo que fue detectado por los marcadores moleculares y por los caracteres agronómicos usados en este trabajo. Esos resultados se confirmaron en el presente trabajo, donde las diferencias entre las líneas CML282 y LUG282, se marcan desde los tres puntos de vista abordado en el presente trabajo, que son dos marcadores moleculares (SSR e ISTR) y uno morfológico (datos agronómicos), así mismo, se encontraron diferencias entre las dos versiones de LUG03.

La verificación de las diferencias entre los materiales que se eligen para mejoramiento genético, tiene gran importancia, ya que como se ha reportado desde los trabajos de Brieger (1949), el fenotipo de los híbridos depende de una complicada interacción entre los alelos del mismo o de diferentes loci. Si se cruzan dos líneas de diferentes variedades, los efectos de la heterosis pueden presentarse de manera más pronunciada que cuando los padres se encuentran emparentados o son híbridos (Brieger, 1949; Passoupathy y col., 2015).

La disponibilidad de los avances en genómica, ha proporcionado herramientas para encaminar investigaciones hacia la descomposición de la heterosis en sus bases genéticas. Predecir la heterosis usando marcadores moleculares, es el primer paso para dirigirse a este punto. Passoupathy y col., (2015) realizaron una revisión de los avances hechos hasta el momento, en cuestión de la predicción de la heterosis con marcadores moleculares. En esa revisión se reporta que existe una correlación débil o no significativa usando varios marcadores y también resultados contrastantes utilizando marcadores para predecirlo en diferentes cultivos. Estos autores reportan que para maíz, con los marcadores RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) no se encontraron resultados adecuados

para la predicción de heterosis, en cambio en combinación con los datos morfológicos, se obtiene una correlación positiva entre las distancias genéticas. Así mismo reportan que los marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) son útiles para la predicción de rendimiento, ya que se encontró relación entre QTL's (Quantitative Trait Loci) de rendimiento que se asocian a loci con efecto en esta misma variable. Con los marcadores SSR se tiene una difícil predicción de heterosis y de rendimiento, pero en conjunto con los AFLP se facilita la predicción de cruzas. Estos autores reportan que no es conveniente el uso de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) para la predicción de heterosis.

Los resultados del presente trabajo demuestran que con el marcador molecular aleatorio ISTR, se encontró una mayor distancia genética entre los materiales con mayor valor de expresión heterótica LUG282XLUG03 I F1. Se requeriría *a posteriori*, incrementar la documentación del poder de detección de este marcador, con un mayor trabajo de asociación con los resultados de campo. En trabajos previos, se ha encontrado que son necesarias al menos tres combinaciones de iniciadores para detectar una asociación adecuada de los individuos estudiados, debido a que es un marcador que detecta mucha variabilidad (Khaliq y col., 2011; Torres-Morán y col., 2012) y al igual que otros marcadores que se basan en la posición de retrotransposones, como el IRAP (Interretrotransposon amplified polymorphism), reportan alta variabilidad entre individuos (Hosid y col., 2012) y pueden detectar secuencias no codificantes (Havecker y col., 2004).

En lo que se refiere a las variables agronómicas, las diferencias significativas encontradas en casi todas, concuerdan con lo reportado por diversos autores, con respecto a las diferencias genéticas que deben existir entre los genotipos involucrados y que se expresan a nivel fenotípico (Porceddu y Jenkins, 1981; Ranvidra y col., 2012; Rider y col., 2014).

En cuanto a la heterosis, se encontró que las líneas con menor nivel de parentesco, mostraron un valor más alto de heterosis, encontrándose un valor de heterosis con respecto al mejor padre de 486.59 en la crusa LUG282XLUG03 F1 I y de 501 en la misma crusa, con respecto al promedio de los padres; estos resultados concuerdan con el estudio clásico de Moll et al. (1965) con poblaciones tropicales y templadas de los EUA, es decir que la

heterosis en maíz se incrementa con la distancia genética y que hay un nivel óptimo en el que se presentan decrementos en casos de cruzas entre progenitores muy distantes.

## IX CONCLUSIONES

La utilización de los marcadores moleculares SSR e ISTR en el presente trabajo, uno codominante y otro dominante, permitió comparar la información que proporcionan con respecto a un mismo genoma. El nivel de diferencia que se encontró entre los individuos de la línea LUG03 difiere entre los dos marcadores, debido a su mecanismo de acción, uno basado en microsatélites (SSR) y producto de una previa secuenciación del genoma y otro prácticamente aleatorio y basado en la posición de elementos móviles dentro del genoma (ISTR). Es importante destacar que para detectar pureza varietal, el marcador ISTR es adecuado, basándose en las diferencias detectadas.

Los marcadores morfológicos o datos agronómicos que se obtuvieron, proporcionaron la base para el cálculo de la heterosis, basada en el comportamiento de los materiales en campo. Las diferencias encontradas entre la heterosis producida por los materiales de las diferentes versiones, concuerdan con las diferencias entre ellos, detectadas a nivel molecular.

La prueba de Mantel que se realizó con la finalidad de evaluar si las matrices generadas tanto con datos moleculares como agronómicos eran semejantes. Los resultados no detectaron una asociación confiable entre las matrices de distancias y las relaciones entre éstas no son claras, sin embargo, el mayor valor de coeficiente de correlación ( $r$ ) se produjo entre la comparación de ISTR con SSR.

Por otra parte, los mayores valores de distancia, fueron encontrados con ISTR para la cruce F1, versión I de LUG282 X LUG03 que fue la cruce que presentó el mayor valor de heterosis, lo que implica la posibilidad de usar las distancias genéticas estimadas con marcadores moleculares en la predicción de híbridos sobresalientes en aspectos agronómicos.

Según los resultados obtenidos con el presente trabajo, se concluye que sí es posible detectar la pureza varietal entre líneas autofecundadas, utilizando los marcadores moleculares SSR e ISTR.

## X LITERATURA CITADA

- Agropanorama. 2012. Estadísticas del agro. Pág. WEB. <http://www.agropanorama.com/news/Produccion-Mundial-de-Maiz.htm>
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Ralf M., Roberts K. y Watson J. 1990. *Biología Molecular de la Célula*. Ediciones Omega S.A. 2° Ed. España
- Asbhy E. 1930. Studies on the Inheritance of Physiological Characters. I. A Physiological Investigation of the Nature of Hybrid Vigour in Maize. *Ann. Bot.* 44, 457-67.
- Asbhy E. 1937. Studies in the Inheritance of Physiological Characters. III. Hybrid Vigour in Tomatoes. *Ibid.* N. S. 1, 11-42.
- Avise J. C. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Sinauer Associates. 2nd edition. Sunderland. USA. 684 p
- Balloux F. y Lugon-Moulin N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*. 11: 155–165.
- Balloux F., Brunner H., Lugon-Moulin N., Hausser J. y Goudet J. 2000. Microsatellites can be misleading: an empirical and simulation study. *Evolution*. 54: 1414–1422
- Bonamico N., Aiassa J., Ibañez M., Di Renzo M., Díaz D. y Salerno J. 2004. Caracterización Y Clasificación De Híbridos Simples De Maíz Con Marcadores SSR. *Revista De Investigaciones Agropecuarias*. 33(2), 129-144.
- Brieger, F.G., 1949. The Genetic Basis of Heterosis in Maize. *Genetics* (35) 420-445.
- Bruce A.B. 1910. The Mendelian Theory Of Heredity And The Augmentation Of Vigor. *Science* 32: 627–628.
- Charles A., Butterworth J., Cota-Sánchez H. y Wallace R. S. 2002. Molecular Systematics of Tribe Cacteeae (Cactaceae: Cactoideae): A Phylogeny Based on rpl16 Intron Sequence Variation. *Systematic Botany*. 27: 257-270.
- Chen Z.J. 2010. Molecular Mechanisms Of Polyploidy And Hybrid Vigor. *Trends Plant Sci.* 15: 57–71.

- Chistiakov D. A., Hellemans B., Haley C. S., Law A. S., Tsigenopoulos C. S., Kotoulas G., Bertotto D., Libertini A. y Volckaert F. A. M. 2005. A microsatellite linkage map of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Genetics*. 170:1821-1826
- CIMMYT. 1988. Maize production regions in developing countries. CIMMYT Maize Program. May. 137 pp.
- Clark R., Alfonso C., Eguiarte L. E. y Molina F. 2005. Clonal diversity and distribution in *Stenocereus eruca* (cactaceae), a narrow endemic cactus of the Sonora deserti American. *Journal of Botany*. 92: 272-278.
- Clark J. y Kidwell M. 1997. A Phylogenetic Perspective on P Transposable Element Evolution in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 94: 11428-11433.
- Coto O. y Cornide M . T. 2003. Marcadores moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas La Habana: Félix Varela p 92-119.
- Crawford I., Stepan A. M., McAda P. C., Rambosek J. A., Conder M. J., Vinci V. A. y Reeves C. D. 1995. Production of cephalosporin intermediates by feeding adípico acid to recombinant *Penicillium chrysogenum* Straits expressing ring expansion activity. *Biotechnology. New York*. 13:58-62.
- Crow J.F. 1998. 90 Years Ago: The Beginning Of Hybrid Maize. *Genetics* 148: 923-928.
- Darwin C.R. 1876. *The Effects Of Cross And Self Fertilization In The Vegetable Kingdom*. (London: John Murray).
- Duvick D. N. 2001. Biotechnology in the 1930s: the development of hybrid maize. *Nature Reviews of Genetics* 2, 69-74.
- EASAC. European Academies Science Advisory Council. 2011. *Plant genetic resources for food and agriculture: roles and research priorities in the European Union*. Germany.
- East E. M. 1908. Inbreeding in corn. *Rep. Conn. Agrit. Exp. Sta. for 1907*. 419-428. Heterosis. *Genetics* 21 : 375-397.
- Echt C. S. y Nelson C. D. 1997. Linkage zapping and genome length in Eastern White pine (*Pinus strobus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 94: 1031-1037.

- Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*. 5(6):435-445.
- Escorcía G. N., Molina J. D., Castillo G. F. y Mejía C. J. 2010. Rendimiento, Heterosis Y Depresión Endogámica De Cruzas Simples De Maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33 (3), 271–279.
- Esteva G. y Marielle C. 2003. Sin maíz no hay país. México D.F.: Culturas Populares de México. 154 P. ISBN 970-35-0434-5
- Estoup A. y Angers B. 1998. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations in: G. R. Carvalho (Ed.). *Advances in Molecular Ecology*. IOS Press pp. 55-86
- Ferreira M. y Grattapaglia D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA-CENARGEN, Brasilia, Brasil.
- Franch R., Louro B. y Tsalavouta M. 2006. A genetic linkage map of the hemaphrodite teleost fish *Sparus aurata*. *Genetics*. 174:851-861.
- Glaubitz, J. C. 2004. CONVERT: a user friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Ecology Notes* 4: 309-31.
- Goldstein D. B. y Schlötterer C. 1999. *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford.
- Hamada H., Petrion M. G. y Kakunaga T. 1982. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 79: 6465-6469.
- Harbone W. y Turner L. 1984. *Plant Chemosystematics*. Academic press London. 562.
- Havecker E. R., Gao X. y Voytas D. F. 2004. The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biology*. 5:225.
- Hedrick P. W. 1999. Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53: 313–318.
- Hosid E., Brodsky L., Kalendar R., Raskina O. y Belyayev A. 2012. Diversity of long terminal repeat retrotransposon genome distribution in natural populations of the wild diploid wheat *Aegilops speltoides*. *Genetics*.

- Infante D., Celis C., Molina S., Almaraz N., Delgado E., Naranjo N., Herrera J., Avila J., Torres M. y Morales M. 2006. Curso Utilizacion del ISTR para identificación de Variabilidad en Agaves. IDEA. IPN. CUCBA.
- Infante D., Molina S., Demey J. R. y Gámez E. 2006. Asexual Genetic Variability in Agavaceae Determined with Inverse Sequence-Tagged Repeats and Amplification Fragment Length Polymorphism Analysis. *Plant Molecular Biology Reporter* 24: 205-217.
- Jones D.F. 1917. Dominance Of Linked Factors As A Means Of Accounting For Heterosis. *Genetics* 2: 466-479.
- Khaliq I., Awais Khan M. y Pearce S. 2001. Ty1-Copia retrotransposons are heterogeneous, extremely high copy number and are major players in the genome organization and evolution of *Agave tequilana*. *Genet Resour Crop Evol.*
- Kondon K., Nagafuji H., Hata A., Tomomori C. y Yamanishi K. 1993. Association of human herpesvirus 6 infection of the central nervous system with recurrence of febrile convulsion. *The Journal of Infectious Diseases.* 167: 1197-1200.
- Lee M. 1995. DNA markers and plant breeding programs. *Advances in Agronomy*, 55: 265-341.
- Lewin B, 2000. *Genes VII*. Oxford University Press. USA.
- Lightbourn G. y Villeux R. 2003. Retrotransposons based markers to characterize somatic hybrids an assess variation inducen by protoplast fusion on monoploid potato. *Acta Horticulturae. International Society for Horticultural Science.* 619: 235-242.
- Liu Z. J. y Cordes J. F. 2004. DNA marker Technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture.* 238: 1-37.
- Maize GDB. 2012. Maize Genetics and Genomics Database. Pág. WEB. <http://www.maizegdb.org/>.
- Malik H. S. y Eickbush T. H. 2001. Phylogenetic Analysis of Ribonuclease H Domains Suggests a Late, Chimeric Origin of LTR Retrotransposable Elements and Retroviruses. *Genome Research.* 11: 1187-1197.
- Manly, B. F. J. 1997. *Randomization, Bootstrap and Monte Crops*. India, Agrobotanical Publishers. P. 396.

- Márquez S., F. 1988. Genotecnia Vegetal. Métodos Teoría Resultados. Tomo II. AGT EDITOR, S. A. México. 664 P.
- Matsuoka Y., Mitchell S. E., Kresovich S., Goodman M. y Doebley J. 2002. Microsatellites in Zea- variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. *Theoretical and Applied Genetics*. 104:436-450
- McConnell S. K. J., Beynon C., Leamon J., y Skibinski D. O. F. 2000. Microsatellite marker based genetic linkage maps of *Oreochromis aureus* and *O. Niloticus* (Cichlidae): Extensive linkage Group segment homologues revealed. *Animal Genetics*. 31:214-218.
- Melchinger, A.E., y R.K. GUMBER. 1998. Overview of heterosis and heterotic groups in agronomic crops. En: K.R. Lamkey, J.E. Staub (Eds.). *Concepts and Breeding of Heterosis in Crop Plants*. CSSA, Madison, WI. pp. 29-44.
- Melchinger A.E. 1999. Genetic diversity and heterosis. En: *The genetics and exploitation of heterosis in crops*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America.
- Meyers B. C., Tingey S. V. y Morgante M. 2001. Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome. *Genome Research*. 11:1660–1676.
- Nagy J. A., Dvorak H. F. y Dvorak A. M. 2007. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Annual Review of Pathology-mechanisms of Disease*. 2: 251-275.
- Navarro E. y Borrego F. 1993. Efectos Génicos Y Heterosis En Poblaciones Parentales Y Poblaciones Derivadas De Maíz (*Zea Mays* L). *AGRONOMÍA MESOAMERICANA*. 4, 7-10.
- O’Connell M. y Wright J. M. 1997. “Microsatellite DNA in fishes”. *Reviews in Fish Biology Fisheries*. 7(3): 331-363
- Pardo J., Mercader P. y Mahiques I. 2005. Infliximab in the Management of severe pemphigus vulgaris. *British Journal of Dermatology*. 152, 222.
- Parveen S., A. Shahzad y V. Yadav. 2016. Molecular markers and their applications in plant biotechnology. En: *Biotechnological strategies for the conservation of medicinal and ornamental climbers*. Springer

- Passoupathy R., Hariprasanna K. y Seetharama N. 2015. Prediction of Heterosis in Crop Plants – Status and Prospects. *American Journal of Experimental Agriculture* 9: 1-16.
- Pearce S., Stuart-Royers C., Knox M., Kumar A., Ellis T. y Flavell A. 1999. Rapid Isolation of Plant Ty1-Copia Group Retrotransposons LTR Sequences for Molecular Marker Studies. *The Plant Journal* 19: 711-717.
- Porceddu E. y Jenkins G. 1981. Seed regeneration in cross-pollinated species. *Proceedings of the C.E.C./EUCARPIA Seminar*. Denmark.
- Ravindra K., Srivastava K., Somappa J., Kumar S. y Singh R. K. 2012. Heterosis for yield and yield components in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Electronic Journal of Plant Breeding*. 3: 800-805.
- Reyes P. 1985. *Fitogenotecnia básica y aplicada*. México. Editorial A.G.T.
- Reif J.C., A.R. Hallauer y A.E. Melchinger. 2005. Heterosis and heterotic patterns in maize. *Maydica* (50): 215-223.
- Rhode W. 1996. Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR-based technique for genome analysis in the plant and animal Kingdom. *Journal of Genetics and plant Breeding*. 50: 249 – 261.
- Ryder P., P. McKeown, A. Fort y Ch. Spillane. 2014. Epigenetics and Heterosis in Crop Plants. In: Alvarez-Venegas R. et al., *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications*. International Publishing, Switzerland.
- Rodríguez A. K. 2013. Comparación del patrón molecular de dos líneas de maíz antes y después de la autofecundación por medio de ISTR y SSR. Tesis. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
- Rohlf F. J. 2009. *NTSYSpc. Numerical taxonomy system*. Ver. 2.21 c. Exeter Software. Setauket, New York.
- Sakamoto A., Valverde R., Alia C. T. H. H. y Murata N. 2000. Transformation of Arabidopsis with the codA gene for choline oxidase enhances freezing tolerance of plants. *Plant Journal*. 22: 449-453.

- Sambrook J. y Russell D. W. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ra edicion. New York.
- Saghai Maroof M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A., Allard R. W. 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Science. USA* 83:1757-1761.
- Sanchez J. J. 2003. Apuntes de la materia “Manejo de Recursos Fitogenéticos”. CUCBA-UDG.
- SanMiguel P. y Bennetzen J. L. 1998. Evidence that a arecent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. *Annals of Botany.* 82-A: 37-44
- SanMiguel P., Tikhonov A., Jinv Y-K., Motchoulskaia N., Zakharov D., Melake-Berhan A., Springer P. S., Edwards K. J., Lee M., Avramova Z. y Bennetzen J. L. 1996. Nested Retrotransposons in the Intergenic Regions of the Maize Genome. *Science* 274:765–768.
- Sarilar V. C., Ridel A., Rousselet M., Falque M., Tetanneur J-C., Eber F., Chèvre A-M., Brabant P. y Alix K. 2010. What is the Impact of Allopolyploidy on Transposable Elements? A structural Approach on Newly Synthesized Brassica napus Allotetraploids. *Acta Horticulturae International Society for Horticultural Science.* 867:113-117.
- Schwarzer T. y Helsop P. 2000. Practical In situ Hybridization. Springer-Verlag. USA
- Senior M. L., Murphy J. P., Goodman M. M. y Stuber C. W. 1998. Utility of SSRs for Determining Genetic Similarities and Relationships in Maize Using an Agarose Gel System. Published in *Crop Science.* 38:1088-1098.
- Shull G.H. 1908. The Composition Of A Field Of Maize. *Am. Breed. Assoc. Rep.* 4: 296-301.
- Shull G.H.1909. A Pure Line Method Of Corn Breeding. *Am.Breed. Assoc. Rep.* 5: 51-59.
- Shull G. H. 1914. Duplicated genes for capsule form in *Bursa bursapastoris*. *Z. Indukt. Abstammungs u. Vererbungsl.* 12: 97–149
- Sosa P. 2003. Conservacion Genetica de Endemismos Vegetales Amenazados de las Islas Canarias. Unviersidad de las Plamas de Gran Canaria

- Stemshorn K. C., Nolte A. W. y Tautz D. 2005. A genetic map of *Cottus gobio* (Pisces, Teleostei) based on microsatellites can be linked to the physical map of *Tetraodon nigroviridis*. *Journal of Evolutionary Biology*.
- Tapia C. 1998. Caracterización morfológica y molecular de la diversidad genética de la colección de *Pachyrhizus tuberosus* (LAM) Spreng. del CATIE. Thesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 157 p.
- Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorph DNA markers. *Nucleic Acids res.* 17: 6463-6471.
- Tautz D. y Renz M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research.* 12: 4127-4138.
- Torres-Morán M.I., N. Almaraz-Abarca y M. Escoto-Delgadillo. 2012. Review Article: ISTR, a Retrotransposons-Based Marker to Assess Plant Genome Variability with Special Emphasis in the Genera *Zea* and *Agave*. *American Journal of Plant Sciences.* (3):1820-1826.
- Weising K., Nybom H., Wolff K. y Kahl G. 2005. DNA Fingerprinting in Plants. Principles, Methods, and Applications. Taylor & Francis Group, Segunda Edición. E.U.A.
- Wellhausen E. J., Roberts L. M., Hernández X. y Mangelsdorf P. C. 1952. Races of maize in México. Bussey Institute, Harvard University (Cambridge).
- Whitelaw C. A., Barbazuk W. B., Perteza G., Chan A. P., Cheung F. Y., Lee L. Zheng S. Van Heeringen S., Karamychev J. L., Ben-netzen P., SanMiguel N., Lakey J., Bedell Y., Yuan M. A., Budi-man A., Resnick S., Van Aken T., Utterback S., Riedmuller M., Williams T., Feldblyum K., Schubert R., Beachy C. M., Fraser J. y Quackenbush. 2003. Enrichment of gene-coding sequences in maize by genome filtration. *Science.* 302: 2118-2120.
- Wright J. M. 1993. Nucleotide sequence and evolutionary conservation of a minisatellite variable Lumber tandem repeat cloned from Atlantic salmon. *Salmo solar*. *Genomes.* 36: 271-277
- Young W. P., Wheeler P. A., Coryell V. H., Keim P., y Thorgaard G. H. 1998. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids. *Genetics.* 148: 839-850.
- Young-An B. y Kong Y. 2003. Divergent Long-Terminal-Repeat Retrotransposon Families in the Genome of *Paragonimus westermani*. *Korean Journal of Parasitology.* (41) 4: 221-232.