



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**DETERMINACIÓN DE PUREZA GENÉTICA DE CUATRO LÍNEAS
PARENTALES DE MAÍZ (*Zea mays* L.) CON DOS CATEGORÍAS
MEDIANTE CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR**

Por

Aurelio Pérez Valenciano

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

Aprobado por:
Dr. Lino De la Cruz Larios

Dr. Lino De la Cruz Larios
Director de Tesis e integrante del jurado

Fecha

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

Fecha

Dr. Martha Escoto Delgadillo
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

Fecha

M. en C. José Pablo Torres Morán
Sinodal e integrante del jurado

Fecha

Dra. Patricia Zarazúa Villaseñor
Sinodal e integrante del jurado

Fecha

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**DETERMINACIÓN DE PUREZA GENÉTICA DE CUATRO
LÍNEAS PARENTALES DE MAÍZ (*Zea mays* L.) CON DOS
CATEGORÍAS MEDIANTE CARACTERIZACIÓN
MORFOLÓGICA Y MOLECULAR**

Tesis

Que para obtener el grado de

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

Presenta

Aurelio Pérez Valenciano

Director

Lino De la Cruz Larios

**DETERMINACIÓN DE PUREZA GENÉTICA DE CUATRO LINEAS
PARENTALES DE MAÍZ (*Zea mays* L.) CON DOS CATEGORIAS MEDIANTE
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MARCADORES MOLECULARES**

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi familia, a la empresa Novasem Innovaciones y a la Universidad de Guadalajara

AGRADECIMIENTOS

A mi papá por instruirme en este oficio

A mi hermana y mi mamá por apoyarme y estar conmigo en todo momento

A mis compañeros de trabajo Alejandro, Diego, Ivan y Hassan por todo el trabajo que hicieron conmigo, por acompañarme a campo los fines de semana y ayudarme en laboratorio pero principalmente agradecerles por su amistad.

A Berna por toda su asesoría y conocimientos en campo

A Rafael Ochoa por confiar en mí y darme esta oportunidad

A todos mis maestros y asesores, especialmente al doctor Lino por dirigirme estos cuatro semestres

A todos los estudiantes, practicantes y voluntarios que me ayudaron en laboratorio

Y sobre todo a la doctora Isabel y a Gil, por ser tan pacientes conmigo, enseñarme todos los días algo nuevo y responder a todas mis preguntas. Sin su arduo trabajo en laboratorio esta tesis no hubiera sido posible. Espero conservar su amistad por mucho tiempo y volver a trabajar con ustedes.

Índice

RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1. Objetivos	16
1.2. Hipótesis.....	16
II. Antecedentes.....	17
2.1. Características del maíz.....	17
Cuadro 1. Clasificación taxonómica del maíz OCDE (2003)	18
2.2. Crecimiento del maíz	18
2.3. Producción mundial de maíz	19
2.4. Importancia del maíz en México	20
2.5. Híbridos de maíz	21
2.6. Líneas puras o parentales	22
2.7. Calidad de la semilla de maíz.....	23
2.8. Importancia de la pureza genética.....	24
2.9. Marcadores Genéticos.....	26
2.10. Marcadores morfológicos.....	27
2.11. Marcadores moleculares.....	28
2.12. PCR.....	31
2.14. Marcador molecular SSR	33
2.15. Marcador molecular ISSR.....	35
2.16. Definición de polimorfismo	36
III. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1. Sitio de estudio.....	38
3.2. Material genético.....	38
3.3. Caracterización morfológica	39
3.4. Extracción de ADN	49
3.5. Marcador molecular ISSR.....	49
3.6. Marcador SSR	50
3.7. Análisis estadístico.....	51
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4.1. Características morfológicas	52
4.2 Caracterización molecular por ISSR	72

4.3 Caracterización por SSR	81
V. CONCLUSIONES	83
VI. BIBLIOGRAFÍA	85
VII. ANEXOS	92

Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del maíz.....	18
Cuadro 2. Etapas fenológicas del cultivo de maíz.....	19
Cuadro 3. Características morfológicas en primera hoja y hoja evaluadas en campo para cuatro líneas parentales de maíz con dos categorías.....	42
Cuadro 4. Características morfológicas en tallo y espiga evaluadas en campo para cuatro líneas parentales de maíz con dos categorías.....	43
Cuadro 5. Características morfológicas en jilote, planta y mazorca, evaluadas en campo para cuatro líneas parentales de maíz con dos categorías	44
Cuadro 6. Primers utilizados para el marcador SSR	50
Cuadro 7. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de hoja y tallo en las dos categorías de la Línea A.....	52
Cuadro 8. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de espiga en las dos categorías de la Línea A.....	54
Cuadro 9. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de mazorca en las dos categorías de la Línea A.....	55
Cuadro 10. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de hoja y tallo en las dos categorías de la Línea B	56
Cuadro 11. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de espiga en las dos categorías de la Línea B	57
Cuadro 12. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de mazorca en las dos categorías de la Línea B	58
Cuadro 13. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de hoja y tallo en las dos categorías de la Línea C	59
Cuadro 14. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de espiga en las dos categorías de la Línea C	60
Cuadro 15. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de mazorca en las dos categorías de la Línea C	61
Cuadro 16. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de hoja y tallo en las dos categorías de la Línea D.....	62
Cuadro 17. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de espiga en las dos categorías de la Línea D.....	63

Cuadro 18. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de mazorca en las dos categorías de la Línea D.....	64
Cuadro 19. Valores propios de la matriz de correlación para componentes principales de datos morfológicos de cuatro líneas parentales de maíz, con dos categorías	65
Cuadro 20. Vectores característicos para componentes principales de datos morfológicos de cuatro líneas parentales de maíz, con dos categorías	68
Cuadro 21. Vectores característicos para componentes principales de datos morfológicos de cuatro líneas parentales de maíz, con dos categorías	69
Cuadro 22. Vectores característicos para componentes principales de datos morfológicos de cuatro líneas parentales de maíz, con dos categorías	70
Cuadro 23. Comparativo de los promedios de variables morfológicas de hoja y tallo, en cuatro líneas parentales de maíz, con dos categorías.....	90
Cuadro 24. Comparativo de los promedios de variables morfológicas de espiga y jilote, en cuatro líneas parentales de maíz, con dos categorías	92
Cuadro 25. Comparativo de los promedios de variables morfológicas de mazorca, en cuatro líneas parentales de maíz, con dos categorías.....	93

Índice de Figuras

Figura 1. Aplicación de los marcadores moleculares.....	30
Figura 2. Aplicación de tratamiento químico a la semilla.....	40
Figura 3. Siembra de las líneas parentales.....	40
Figura 4. Características evaluadas en la hoja: a) Hoja: ancho de lámina, b) Coloración de la lámina, c) Angulo de inserción de las hojas por arriba de la mazorca superior.....	45
Figura 5. Características evaluadas en el tallo: coloración por antocianinas en nudos y diámetro en la parte media del entrenudo de la mazorca superior (mm).....	45
Figura 6. Características evaluadas en espiga: coloración por antocianinas en las anteras y ángulo...	46
Figura 7. Evaluación de características: intensidad de la coloración por antocianinas y altura de la planta.....	46
Figura 8. Características morfológicas evaluadas en mazorca y longitud de pedúnculo.....	48
Figura 9. Características morfológicas evaluadas en mazorca y arreglo de hileras de granos.....	49
Figura 10. Gráfica Biplot que muestra la ubicación de las líneas de maíz con sus categorías con respecto a las variables morfológicas evaluadas.....	66
Figura 11. Patrones de amplificación específicos en geles de agarosa de alta resolución para la línea A con dos categorías de semilla, con los cinco iniciadores ISSR utilizados: A: John, B: Mao, C: Manny, D: 812 y E: 898.....	71
Figura 12. Patrones de amplificación específicos en geles de agarosa de alta resolución para la línea B con dos categorías de semilla, con los cinco iniciadores ISSR utilizados: A: John, B: Mao, C: Manny, D: 812 y E: 898.....	72
Figura 13. Patrones de amplificación específicos en geles de agarosa de alta resolución para la línea C con dos categorías de semilla, con los cinco iniciadores ISSR utilizados: A: John, B: Mao, C: Manny, D: 812 y E: 898.....	73

Figura 14. Patrones de amplificación específicos en geles de agarosa de alta resolución para la línea D con dos categorías de semilla, con los cinco iniciadores ISSR utilizados: A: John, B: Mao, C: Manny, D: 812 y E: 898.....	74
Figura 15. Dendrograma de similitud con el coeficiente de Jaccard para la línea A con dos categorías.....	75
Figura 16. Dendrograma de similitud con el coeficiente de Jaccard para la línea B con dos categorías.....	76
Figura 17. Dendrograma de similitud con el coeficiente de Jaccard para la línea C con dos categorías.....	77
Figura 18. Dendrograma de similitud con el coeficiente de Jaccard para la línea D con dos categorías.....	78
Figura 19. Patrones de amplificación específicos representativos de geles de agarosa de alta resolución para la línea parental B con dos categorías con 6 de los 10 iniciadores SSR utilizados: 1: phi120, 2: phi96100, 3: phi099, 4: phi076, 5: phi0109188 y 6: phi15987.....	79

RESUMEN

La calidad de la semilla de un híbrido, requiere la confirmación de su pureza genética, debido a que una de las principales causas de contaminación es la autopolinización de la madre y la introducción de polen externo durante su producción en el campo. El análisis de la pureza genética es importante para garantizar que las semillas se ajusten uniformemente al tipo varietal. El objetivo del presente trabajo es determinar la pureza genética de cuatro líneas parentales de maíz. Se midieron caracteres morfológicos, de acuerdo a la guía técnica para la descripción varietal de maíz (SNICS, 2014) en cuatro líneas parentales de maíz (líneas A, B, C y D) producidas en el ciclo primavera-verano 2017. Se utilizaron dos categorías de semilla (registrada y original) por cada línea parental y 50 individuos por cada categoría. Además se utilizaron los marcadores moleculares SSR (Simple Sequence Repeats) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), para generar un patrón de amplificación específico para las cuatro líneas parentales y detectar la proporción de plantas fuera de tipo. La evaluación de los datos morfológicos evaluados en campo, permitió observar la similitud entre las categorías de semilla de cada línea, mediante el análisis de componentes principales, donde la línea parental C tiene mayor similitud entre las categorías de semilla evaluadas. Los valores más altos de similitud genética obtenidos con el marcador ISSR se presentaron en la línea parental D, con un coeficiente del 0.74 a 1. El resultado obtenido con los iniciadores SSR utilizados en este estudio, distribuidos en los diez cromosomas del maíz, generó un perfil polimórfico en la línea parental A, obtenido con el iniciador PHI120. Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron demostrar que el uso de los marcadores morfológicos y los marcadores moleculares SSR e ISSR permite determinar la pureza genética de las líneas parentales de maíz utilizadas para la producción de híbridos

ABSTRACT

The quality of the seed of a hybrid requires confirmation of its genetic purity, since one of the main causes of contamination is the self-pollination of the female and the introduction of external pollen during its field production. The analysis of genetic purity is important to analyze that the seeds are uniformly adjusted to the varietal type. In this work, morphological characters were measured, according to the technical guide for the maize varietal description (SNICS, 2014) in four maize parental lines (lines A, B, C and D) produced in the spring-summer 2017 cycle and that are used for the production of hybrids in a seed company, two categories of seed (registered and original) were used for each parental line and 50 individuals for each category. In addition, the molecular markers SSR (single sequence repeats) and ISSR (single sequence repeats) were used to generate a specific amplification pattern for the four parental lines and detect the proportion of Off-type plants. The evaluation of the morphological traits evaluated in field, allowed to observe the similarity between the seed categories of each line. The principal components analysis showed that the parental line C has a greater similarity between the seed categories evaluated. The highest values of genetic similarity obtained with the ISSR marker were presented in the parental line D, with a coefficient of 0.74 to 1. The result obtained with the SSR initiators used in this study, distributed in the ten maize chromosomes, generated a polymorphic profile in the parental line A, obtained with the primer PHI120. The results obtained in the present work allowed to demonstrate that the use of morphological markers along with the molecular markers SSR and ISSR allows to determine the genetic purity of the parental lines of maize used for the production of hybrids

1. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.), es el cultivo más importante y representativo de México. De acuerdo al servicio de información agroalimentaria y pesquera, en el año 2017, se sembraron más de 8 millones de hectáreas, con una producción aproximada de: 27, 762,480 toneladas de grano y 16, 669,014 toneladas de forraje. La importancia del maíz en México puede ser observada desde el punto de vista alimentario, industrial, político y social; su alcance radica en la amplia utilización para la alimentación humana y animal. (Gutiérrez *et al.*, 2016).

La pureza genética es uno de los requerimientos principales para la calidad de semillas. La presencia de autofecundaciones, cruzamientos y contaminantes en la semilla de maíz tienen efectos negativos en el rendimiento y uniformidad (Chen *et al.*, 2005). Entre otros factores que afectan la pureza genética de la semilla se pueden mencionar además, mezcla de las semillas de los progenitores antes de la siembra, fuentes impuras de semilla y eliminación inadecuada de plantas atípicas, contaminación con polen foráneo, desespigamiento imperfecto de las hembras (Macrobert *et al.*, 2015)

Como mencionan Smith y Register (1998) se debe alcanzar un elevado nivel de pureza genética en los cultivos y este debe mantenerse para mejorar el desempeño agronómico, fomentar la inversión y la innovación en el mejoramiento genético y para asegurar que las mejoras en la calidad y productividad impartidas por los mejoradores lleguen a los productores. Los marcadores basados en las características morfológicas se utilizan como base para las evaluaciones de pureza genética. Los marcadores morfológicos son características fenotípicas de fácil identificación visual tales como forma, color, tamaño o altura. Muchos de ellos se convierten en importantes descriptores, a la hora de inscribir nuevas variedades (Picca *et al.*, 2007), sin embargo, las observaciones repetidas de campo son tardadas, caras y dependen del medio ambiente.

La morfología no puede proporcionar información sobre la pureza de atributos genéticos específicos, Gowda *et al.*, (2015) en trabajos similares han demostrado que los marcadores moleculares ofrecen varias ventajas sobre los marcadores morfológicos ya que proveen información que puede ser analizada objetivamente, dando una nueva dimensión al mejoramiento, especialmente respecto al tiempo requerido para desarrollar nuevas

variedades mejoradas (Jonah *et al.*, 2011). No obstante, los marcadores morfológicos permanecen como caracteres útiles en la identificación de materiales dado que representan un conjunto de genes que pueden ser evaluados con métodos sencillos (Picca *et al.*, 2007).

A pesar de las desventajas que presentan los marcadores morfológicos mencionadas anteriormente, en el contexto del maíz y de otros cultivos aún son de importancia considerable en México, ya que la certificación y el registro de nuevos híbridos de maíz son efectuados por el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) el cual se basa en los marcadores morfológicos.

Existen en México por lo menos 67 empresas semilleras de maíz y más de 380 híbridos de maíz en el mercado (INTAGRI, 2016), por lo cual para las empresas productoras de semilla de maíz es importante ofrecer híbridos con el nivel de calidad más alto posible.

Otra forma de determinar la pureza genética es por medio del uso de marcadores moleculares, por definición, los marcadores moleculares son loci genéticos que pueden ser fácilmente rastreados y cuantificados dentro de una población y pueden ser asociados con un gen particular o una característica de interés (Hayward, *et al.*, 2015). Los marcadores genéticos son las características biológicas que son determinadas por las formas alélicas de los genes o loci genéticos y que pueden ser transmitidos de generación en generación (Jiang, 2010). Representan diferencias entre organismos individuales o especies, generalmente no representan los propios genes de interés pero actúan como señales que indican su presencia (Collard *et al.*, 2005).

Por lo anterior expuesto, se considera que es de vital importancia que los materiales que se ofrecen al público por parte de las empresas productoras de semilla deberán ser materiales de alta calidad, tanto en la semilla original como en la semilla registrada; por lo que esta investigación tratará de determinar el coeficiente de similitud entre los materiales. Para lo cual se establecieron lotes experimentales en campo y en laboratorio.

1.1. Objetivos

Objetivo general

Determinar la pureza genética de cuatro líneas parentales de maíz, propiedad de una empresa productora de híbridos de maíz, comparando la semilla de categoría original con la de categoría registrada

Objetivos específicos

- Establecer el cultivo de cuatro líneas parentales de maíz con dos categorías en el municipio de Sayula, Jalisco. Para realizar una caracterización morfológica basada en la guía técnica para la descripción varietal de maíz (SNICS)
- Obtener patrones de amplificación de las cuatro líneas parentales de maíz con dos categorías mediante los marcadores moleculares SSR e ISSR

1.2. Hipótesis

Las líneas puras de maíz evaluadas de categoría registrada, utilizadas en la actualidad como parentales para la producción de híbridos de maíz simples y trilineales, mantienen la misma pureza genética que las líneas puras de categoría original, de donde fueron obtenidas.

II. Antecedentes

2.1. Características del maíz

El maíz (*Zea mays L.*), es un miembro de la tribu Maydeae de la familia Poaceae. En el cuadro 1 se muestra la clasificación taxonómica del maíz. Es una planta monoica, de porte robusto y hábito anual, la cual requiere de la ayuda del hombre para dispersar sus semillas, para su propagación y supervivencia. La planta del maíz es la más eficiente para capturar la energía del sol y convertirla en alimento, tiene además una gran plasticidad que la hace adaptarse a diferentes condiciones extremas de humedad, luz solar, altitud y temperatura (OCDE, 2003). El nutriente que el maíz necesita en mayor cantidad es el nitrógeno, con un requerimiento de casi 200 kilogramos por hectárea, un cultivo de maíz que rinde 10 000 kilogramos por hectárea, contiene alrededor de 130 kilogramos de nitrógeno en el grano cosechado y una cantidad adicional de 60-65 kg en los restos no cosechados del cultivo (Nafziger, 2016).

El maíz posee más de 32,000 genes, en diez cromosomas, con un genoma de 2.3 gigabases (Hossain *et al.*, 2016). Los parientes silvestres más cercanos al maíz son los teocintles, los cuales pertenecen al género *Zea*, fuera del género *Zea* los parientes silvestres más cercanos son del género *Tripsacum*. El maíz es producido en un rango de altitudes y latitudes mayor que el de cualquier otro cultivo, en temperaturas que van desde frías hasta calientes, en terrenos húmedos hasta semiáridos y en diferentes tipos de suelo (Shiferaw *et al.*, 2011).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del maíz OCDE (2003)

Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Género	Zea

2.2. Crecimiento del maíz

El sistema para clasificación de etapas o estadios utilizado por la Universidad de Iowa (Iowa State University of Science and Technology) divide al desarrollo de la planta en etapas vegetativas y etapas reproductivas. En el cuadro dos se presentan las etapas de crecimiento del maíz.

- **Etapas vegetativas:** Las etapas vegetativas (V) se caracterizan por la presencia del collar de una hoja en hojas emergidas. Cuando un collar es visible, la hoja se considera completamente emergida y se cuenta en el esquema de etapas. Las etapas vegetativas del desarrollo comienzan con la emergencia (VE) y continúan de forma numérica con cada hoja sucesiva hasta que emerge el penacho (VT)
- **Etapas reproductivas:** Las etapas reproductivas se caracterizan por la emergencia de granos en desarrollo en la mazorca, excepto por la primera etapa reproductiva (R1), que se identifica únicamente por la emergencia de estigmas de las espigas. Hay seis etapas reproductivas.

Cuadro 2. Etapas fenológicas del cultivo de maíz

Etapas vegetativas	Etapas reproductivas
VE Emergencia	R1 Aparición de los estigmas
V1 Primera hoja	R2 Ampolla
V2 Segunda hoja	R3 Grano lechoso
V3 Tercera hoja	R4 Grano pastoso
V(n) Enésima hoja	R5 Grano dentado
VT Aparición de penachos	R6 Grano maduro

2.3. Producción mundial de maíz

El maíz se originó en México y América central (Hossain, *et al.*, 2016). En la actualidad el maíz se cultiva para grano o forraje en alrededor de 188 millones de hectáreas en todo el mundo. En la última década, el área total de maíz aumentó más de un 20 por ciento, el área total de trigo supera la del de maíz, y el área de arroz es casi tan grande como el de maíz, aunque la producción global de maíz supera ampliamente ambas. Por ello, la producción de maíz desempeña un papel importante en la agricultura mundial, tanto a nivel económico como agronómico (Endicott *et al.*, 2015).

De acuerdo a los datos de la Asociación Nacional de Productores de Maíz de Estados Unidos (National Corn Growers Association) se estima que la producción de maíz, a nivel mundial en el periodo que comprende del 1 de octubre de 2018 al 30 de septiembre de 2019 será de 1099.6 millones de toneladas, siendo Estados Unidos, China y Brasil los principales productores.

En cuanto a los distintos usos que se le pueden dar a este cereal, el maíz tiene un amplio rango, mayor que cualquier otro cereal, como alimento humano y animal, como grano y forraje y para uso industrial en diferentes formas. A nivel mundial, cerca de 66% del total de maíz cosechado se destina a la alimentación animal, 20% es consumido directamente, 8% es usado en procesos industriales para producir alimentos y otros productos y 6% se utiliza para semilla o se pierde. En los países industriales, cerca del 70% de la producción de maíz

se dedica a la alimentación animal. En contraste, en los países en desarrollo, de bajos ingresos, el uso del maíz como alimento animal está alrededor del 20%, mientras que el 80% se destina al consumo humano e industrial (Rojas, 2015).

2.4. Importancia del maíz en México

México se encuentra dentro de los centros primarios de domesticación y diversidad del maíz. Las evidencias más recientes indican que el maíz fue domesticado en un evento único en la zona sur de México alrededor de 9000 años atrás.

Muchos investigadores creen que el maíz se originó en México donde el maíz y el teocintle han coexistido desde la antigüedad y donde ambas especies presentan una diversidad muy amplia (Bellon , 2006).

El maíz es el cultivo más representativo de México con un consumo promedio *per cápita* al año de 196.4 kg de maíz blanco además de ser parte del 14.47% del PIB agrícola nacional y el 84.43% de la producción de cereales (SAGARPA, 2017).

En México el maíz se cultiva en una amplia variedad de entornos de producción, en términos de altitud, temperatura, regímenes de humedad, tipos de suelo y tecnologías de producción (Arista *et al.*, 2012). El maíz es el cultivo gramíneo más importante en México con un 36% de la superficie total cultivada y su productividad promedio es de aproximadamente 3.5 toneladas por hectárea (Nuñez y Sempere 2016).

En México se siembran más de 8 millones de hectáreas, con una producción aproximada de: 27, 762,480 toneladas de grano y 16, 669,014 toneladas de forraje (SIAP 2017). Prácticamente 3 millones de personas trabajan en el cultivo del maíz, equivalente a más del 40% de la fuerza de trabajo del sector agrícola o cerca de un ocho por ciento del total de la fuerza laboral de México. Estas cifras equivalen a unos 18 millones de personas (UNAM, 2007; SAGARPA, 2008).

De acuerdo a Zavala *et al.*, (2014) el estado de Jalisco gracias a sus condiciones climáticas destaca como productor de maíz a nivel nacional: es buen productor de maíz grano y, sobre todo, de semilla. Es uno de los grandes productores de maíz a escala nacional: ocupa actualmente el segundo lugar. La entidad destaca por su producción de maíz blanco, aunque

hoy se encuentra también ante el reto de producir amarillo. El maíz es el cultivo más importante del estado que se favorece de un buen temporal debido a las lluvias que ingresan desde el Pacífico y riegan la parte occidental de la República Mexicana.

De acuerdo a los datos del Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera, en el año 2018 en el ciclo primavera-verano, se sembraron en Jalisco 576,875 hectáreas de maíz, en las modalidades de riego y de temporal, con una producción obtenida de 1, 658,658 toneladas de grano.

2.5. Híbridos de maíz

Un híbrido, es una cruce entre dos líneas puras. Las dos líneas parentales de la semilla híbrida son producidas de manera separada, cada una con una población diferente usando una extensa selección a través de generaciones para ayudar a concentrar genes de interés dentro de cada población (Nafziger, 2016).

Para la obtención de un híbrido de maíz, es necesario el cruzamiento de líneas puras obtenidas por autofecundación (fecundadas con ellas mismas hasta alcanzar líneas homogéneas, este proceso se repite de 8 a 9 ocasiones)

Una vez que ocurre esto, se produce la heterosis, o vigor híbrido, y las plantas producidas a partir de las semillas híbridas suelen ser más resistentes y con características mejoradas, lo que incluye un mayor rendimiento del grano. Esta semilla posee una configuración genética única, resultado de ambos progenitores, y produce una planta con ciertas características, como una madurez específica, resistencia a enfermedades, cierto color de grano, calidad de procesamiento, etcétera (Macrobert y Setimela, 2015).

Cuanto menos relacionadas están las dos líneas endogámicas, más heterosis se produce. La heterosis es una importante propiedad de las especies híbridas. 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 (Rodríguez, 2016).

Tipos de híbridos de maíz

En el caso del maíz, de acuerdo con SNICS, (2014) existen varios tipos de híbridos, entre los que se encuentran:

- Híbrido de cruza simple: primera generación resultante del cruzamiento entre dos líneas autofecundadas.
- Híbrido de cruza doble: primera generación resultante del cruzamiento entre dos híbridos de cruza simple.
- Híbrido trilineal: primera generación resultante del cruzamiento de un híbrido de cruza simple con una línea autofecundada.
- Mestizo: primera generación resultante del cruzamiento de una variedad de polinización libre con una línea autofecundada o con un híbrido de cruza simple.
- Híbrido varietal: primera generación resultante del cruzamiento entre dos variedades de polinización libre

En el siguiente apartado se presentan las definiciones de las categorías de semilla evaluadas en este estudio.

2.6. Líneas puras o parentales

- De acuerdo a la regla de calificación de maíz del SNICS, (2014) las líneas endogámicas o puras se definen como: “una variedad vegetal que resulta de un proceso de generaciones sucesivas de autopolinización controlada o de al menos cinco generaciones de retrocruzamiento hacia un progenitor recurrente con selección o sus equivalentes». También puede ser aquella que ha sido obtenida a través de la metodología de dobles haploides.

Categorías de semilla

En el presente trabajo se estudiaron dos categorías de semillas, semilla de categoría original y semilla de categoría registrada, las cuales de acuerdo a la ley federal de Producción, Certificación y Comercio de semillas en México se definen como:

- **Semilla de categoría original:** Esta semilla constituye la fuente inicial para la producción de semillas de las categorías Básica, Registrada y Certificada y es el resultado de un proceso de mejoramiento o selección de variedades vegetales. La semilla Original conserva caracteres pertinentes con los que la variedad fue inscrita en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV)
- **Semilla de categoría básica o registrada:** Por definición legal es «la que conserva un muy alto grado de identidad genética y pureza varietal, proviene de una semilla Original y de la misma Básica y es producida y reproducida o multiplicada cumpliendo con las Reglas a que se refiere la Ley». Esta semilla se produce mediante polinización controlada o apareamiento aleatorio entre plantas fértiles procedentes de la semilla original.

2.7. Calidad de la semilla de maíz

Existen en México por lo menos 67 empresas semilleras y más de 380 híbridos de maíz en el mercado (INTAGRI, 2016), por lo cual para las empresas productoras de semilla de maíz es importante ofrecer híbridos con el nivel de calidad más alto posible, de acuerdo a Gowda *et al.*, (2015) las características de la calidad de la semilla pueden dividirse en tres componentes:

- Pureza física y cualidades fisiológicas de la semilla proveniente de un lote específico de semillas;
- Calidad genética, la cual se relaciona con la pureza y la identidad genética del lote de semillas
- Sanidad de las semillas, la cual se refiere a la ausencia de patógenos o plagas de insectos dentro del lote de semillas.

La calidad de las semillas es la sumatoria de los atributos genético, físico, fisiológico y sanitario, que son determinados por las condiciones en las cuales fueron producidas y la información genética que contienen (Chávez, 2015).

2.8. Importancia de la pureza genética

Para las empresas productoras de semilla es de vital importancia mantener un alto grado de pureza genética tanto en sus líneas parentales como en los híbridos. La calidad de las semillas es un factor que influye directamente en el rendimiento de los cultivos. La pureza genética de las semillas (por ejemplo, el porcentaje de contaminación por semillas o material genético de otras variedades o especies) contribuye a la calidad general de las semillas (Bradford 2005).

De acuerdo con Macrobert y Setimela (2015), existen muchos factores clave que determinan el éxito y la calidad de la producción de semilla híbrida, incluyendo los siguientes:

- La identidad, pureza y conservación de la identidad de los progenitores hembra y macho.
- La proporción de surcos hembra a surcos macho, en el campo de producción de semilla.
- Programar el momento en que se siembran las plantas de la hembra y del macho.
- Eliminación oportuna de las espigas de las plantas hembra antes de que produzcan polen y antes de la emisión de estigmas.
- Sincronizar el momento en que emergen los estigmas de las hembras con la producción de polen de los machos.
- Evitar que los estigmas de la hembra se contaminen con polen, especialmente el de otras hembras, de machos atípicos o de plantas foráneas.
- Evitar las mezclas de semilla entre y dentro de las plantas masculinas y femeninas.

Dentro de los investigadores en mejoramiento genético de maíz, Smith, y Register, (1998) señalan que la pureza genética de los cultivos es de vital importancia para los trabajos de investigación, considerando los siguientes factores:

- Para que se pueda obtener protección de propiedad intelectual y que esta sea mantenida posteriormente
- Se puedan crear variedades tanto con apariencia y desempeño agronómico uniformes, que cumplan con las demandas de los productores, procesadores y consumidores
- Poder crear variedades con identidades genéticas estables con el fin de que el desempeño agronómico pueda ser lo más predecible posible dadas fluctuaciones ambientales imprevistas
- Para que los investigadores en mejoramiento genético puedan caracterizar de una forma más precisa y completa, además de medir la diversidad genética.
- Para que los recursos genéticos puedan ser evaluados agronómicamente más a fondo y así puedan ser utilizados para la creación de variedades mejoradas.

El análisis de pureza genética es utilizado por los productores de semilla como una herramienta de aseguramiento de la calidad para identificar: Polinizaciones cruzadas, autofecundaciones (cuando aplique), mezclas de semillas e intercambio de semillas. Y por los mejoradores, reguladores y productores como un análisis para el cumplimiento normativo (Vigoroux, 2008).

El uso de semillas con un nivel inferior de pureza genética puede resultar en la segregación de características deseadas, un menor rendimiento y la deterioración genética de las variedades (Gowda, 2011).

La pureza genética de una muestra de semillas define el porcentaje de la muestra que no está contaminado por semillas o material genético perteneciente a otras variedades o especies (Nikolic y Crops, 2014).

2.9. Marcadores Genéticos

Los marcadores genéticos son las características biológicas que son determinadas por las formas alélicas de los genes o loci genéticos y que pueden ser transmitidos de generación en generación (Jiang, 2010). Representan diferencias entre organismos individuales o especies, generalmente no representan los propios genes de interés pero actúan como señales que indican su presencia (Collard *et al.*, 2005).

Por definición, los marcadores moleculares son loci genéticos que pueden ser fácilmente rastreados y cuantificados dentro de una población y pueden ser asociados con un gen particular o una característica de interés (Hayward, *et al.*, 2015).

De acuerdo a diversos autores los marcadores genéticos se pueden clasificar en tres categorías principales: Marcadores morfológicos, marcadores bioquímicos y marcadores moleculares.

Kordostrami (2015) indica que hay tres tipos mayores de marcadores genéticos:

- a) Marcadores morfológicos los cuales son características fenotípicas,
- b) Marcadores bioquímicos, los cuales son llamados isoenzimas, que incluyen a las variaciones alélicas de las enzimas y
- c) Marcadores moleculares, los cuales revelan sitios de variación en el ADN.

2.10. Marcadores morfológicos

Los marcadores morfológicos pueden distinguir visualmente cualidades como la estructura de la semilla, color de flor, hábito de crecimiento y otras características agronómicas importantes, son fáciles de usar y no requieren de instrumentos específicos (Nadeem *et al.*, 2017).

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 (Rodríguez, 2016).

Sin embargo evaluar la diversidad basada en caracteres morfológicos y fenotípicos usualmente varía con el ambiente y la evaluación de las características requiere que las plantas se desarrollen en su totalidad antes de su identificación (Jonah *et al.*, 2011).

De acuerdo a Picca *et al.*, (2007), entre las principales desventajas que se presentan con el uso de los marcadores morfológicos se pueden mencionar: i) número reducido de marcadores disponibles en cada población, ii) bajo nivel de polimorfismo, iii) pueden producir alteraciones fenotípicas que dificultan el desarrollo de la planta, iv) varios se hallan bajo control poligénico, v) dominancia, vi) muchos de ellos se expresan en estadio de planta adulta, lo cual prolonga los tiempos de evaluación en los programas de mejoramiento.

Además, los marcadores morfológicos disponibles son limitados y muchos de ellos no están asociados con características económicas importantes (por ejemplo rendimiento y calidad) (Jiang, 2010).

2.11. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares se definen como un fragmento de ADN capaz de revelar mutaciones / variaciones, que pueden ser usadas para detectar polimorfismo entre diferentes genotipos o alelos de un gen para una secuencia particular de ADN en una población o en un pool genético (Jiang, 2010).

Clasificación de los marcadores moleculares.

De acuerdo a lo señalado por los autores, Pokhriyal *et al.*, (2012) los marcadores moleculares poseen propiedades genéticas únicas basadas en las técnicas utilizadas para su detección, se dividen en dos categorías importantes:

- Marcadores basados en la hibridación del ADN:
- Marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Entre las técnicas que han sido usadas ampliamente y son particularmente prometedoras para su aplicación en el mejoramiento se encuentra el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), microsatélites o simple sequence repeat (SSR) y polimorfismo de nucleótido único (SNP) (Jiang, 2010).

El marcador RFLP (Restriction fragment length polymorphism) fue la primera técnica molecular y es el único marcador basado en la hibridación del ADN.

Propiedades de los marcadores moleculares

Los marcadores moleculares poseen características únicas que los hacen útiles para diferentes tipos de estudio, a continuación se mencionan algunas características o propiedades deseables para un marcador molecular de acuerdo a Weising (2005).

- Polimorfismo moderado a elevado
- Herencia codominante (la cual permite la discriminación de homocigotos de heterocigotos)
- Asignación inequívoca de alelos
- Aparición frecuente en el genoma

- Distribución uniforme a lo largo del genoma
- Comportamiento selectivo neutral
- De fácil acceso
- De fácil y rápida ejecución (por ejemplo procesos de automatización)
- Elevada reproducibilidad
- Intercambio de información fácil entre laboratorio

En la actualidad, de acuerdo a lo señalado por Kauffman (2012), existe una gran cantidad de aplicaciones de los marcadores moleculares, en la Figura 1 se menciona alguna de sus aplicaciones principales.

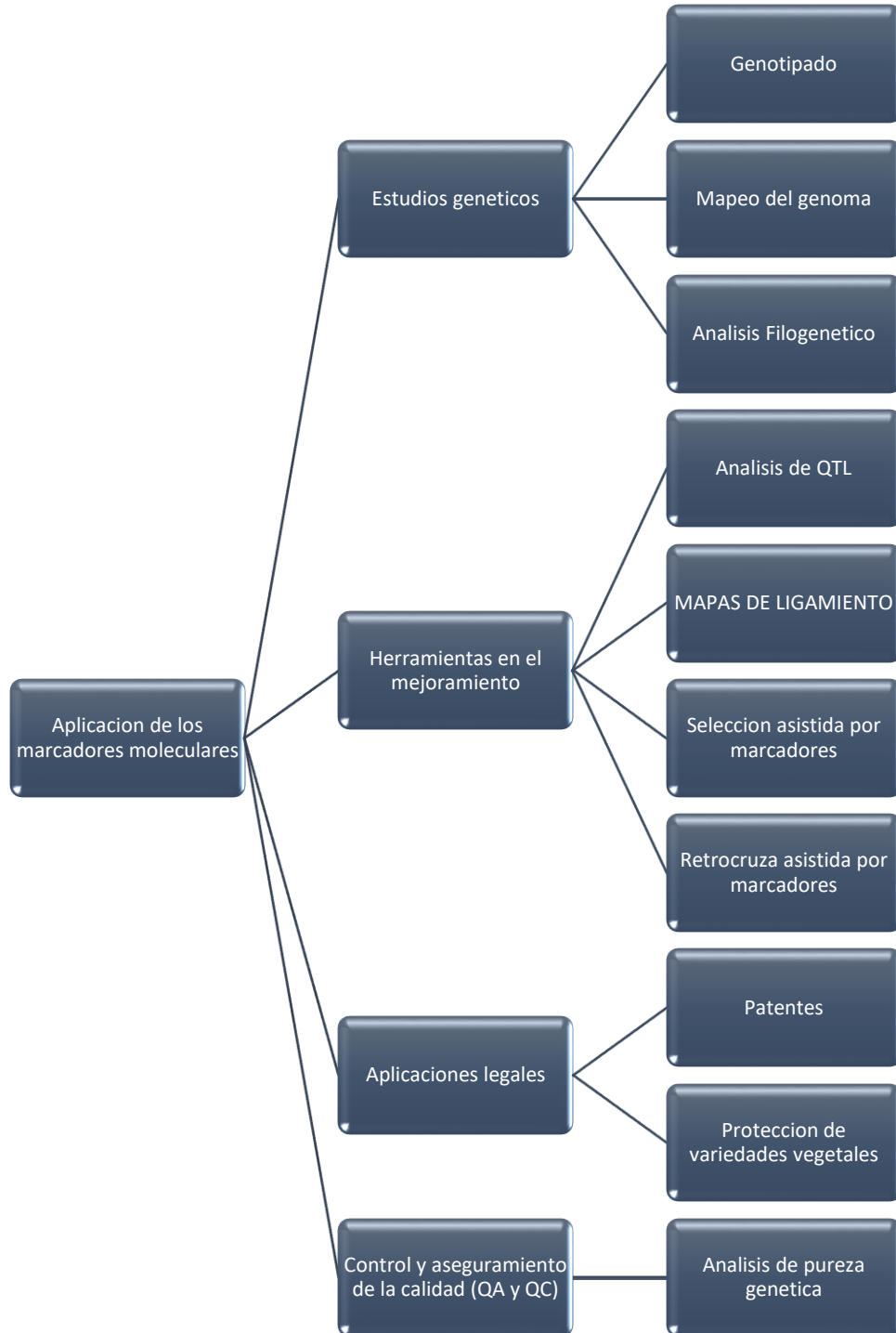


Figura 1. Aplicación de los marcadores moleculares

2.12. PCR

PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es un método *in vitro* de síntesis de ácido nucleico por el cual un segmento de ADN puede ser específicamente replicado. El proceso involucra dos primers de oligonucleótidos que flanquean el fragmento de interés de ADN y la amplificación es lograda mediante la repetición de una serie de ciclos de desnaturalización de ADN por calor, alineamiento del primer a sus secuencias complementarias y la extensión de los primers alineados con una polimerasa de ADN termofílica. Dado que los productos de la extensión son a su vez complementarios a los primers, esencialmente los ciclos sucesivos de amplificación duplican la cantidad del segmento de ADN de interés, sintetizado en el ciclo anterior y el resultado es una acumulación exponencial del fragmento específico (Jonah *et al.*, 2011). Un primer es una secuencia corta de ADN sintético (o ARN) de la cual puede iniciar la replicación del ADN. El primer o iniciador debe ser específico para las secuencias de ADN que se desea replicar y alinearse a elevadas temperaturas, usualmente son de 18 a 30 pb y contienen por lo menos un 50% de contenido GC (Guanina-Citosina). El primer no debe permitir la formación de estructuras secundarias que puedan perjudicar la reacción (Lo y Chan, 2006). Ellos se adhieren a la plantilla de ADN en el punto de inicio y final, donde la polimerasa se une y comienza la síntesis de la nueva hebra de ADN (Rahman *et al.*, 2013).

La idea básica de la técnica es sintetizar muchas veces un fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C), de ahí su nombre comercial más conocido: *taq* polimerasa (Eguiarte *et al.*, 2007).

De acuerdo con Mburu y Hanotte (2005), una reacción de PCR, comúnmente, está caracterizada por el número de ciclos a ejecutarse y por la temperatura y duración de cada uno de los pasos en estos ciclos. La decisión de cuantos ciclos llevar a cabo está basada en la cantidad de ADN del material objetivo con el cual se comienza y también por el número de copias del producto de PCR que sean deseados. En general el estándar para una reacción de PCR es de 25 a 30 ciclos. Esto resulta en un total que van desde las 34 millones a 34 mil millones de copias de la secuencia deseada usando 25 y 35 ciclos respectivamente.

La PCR normalmente se realiza con un volumen de reacción de 20-50 µl en pequeños microtubos de polipropileno estériles que se colocan en el termociclador. Por lo regular se hace una mezcla de reacción (*master mix*) de la reacción de PCR (agua, amortiguador, dNTPs y Taq agregados en ese orden). Ese *master mix* se reparte en varios tubos a los que posteriormente se les agrega ya sea 1 µl de templado de DNA y el par de *primers* específicos. Por lo regular se usa Tris como buffer y cloruro de magnesio (MgCl₂) y cloruro de potasio (KCl) como sales (Tiessen 2012).

2.13. Electroforesis

En relación a lo descrito por Rahman *et al.*, (2013). La electroforesis a través de geles de agarosa o de acrilamida, es un método estandarizado usado para separar, identificar y purificar ácidos nucleicos, dada la naturaleza porosa de estos geles (Barril y Nates, 2014). Las cargas eléctricas, positivas o negativas, están frecuentemente asociadas con las biomoléculas. Cuando son puestas en un campo eléctrico, las moléculas cargadas se desplazan en dirección al electrodo de carga opuesta debido al fenómeno de atracción electrostática. Electroforesis es la separación de moléculas cargadas en un campo eléctrico aplicado, Rahman *et al.*, (2013). El tamaño del producto de PCR puede ser determinado al compararlo con un marcador de peso molecular o escalera de ADN (DNA ladder) el cual contiene fragmentos de ADN de tamaños conocidos, ubicado también dentro del gel.

Como lo mencionan Weising *et al.*, (2005) la electroforesis es una técnica que se utiliza para separar fragmentos de ADN, ARN o proteínas por su tamaño y carga. Las moléculas viajan a través de un gel poroso, a una velocidad inversamente proporcional a su tamaño.

Una vez que la electroforesis se ha completado, el ADN en el gel es teñido con bromuro de etidio o con nitrato de plata, y los resultados se documentan mediante una fotografía o con una cámara de video adjunta a un software de computadora.

2.14. Marcador molecular SSR

Los microsatélites (Simple sequence repeats o short simple repeats) se encuentran entre los marcadores moleculares basados en la PCR han mostrado ser un marcador predilecto para la construcción de mapas moleculares. Las ventajas principales de los SSR son su elevado nivel de polimorfismo, elevada reproducibilidad, naturaleza codominante, especificidad de locus y manejo fácil. Además de estar distribuidos a lo largo del genoma (Kumar, et al., 2009).

Son secciones de ADN que consisten en repeticiones en tándem de nucleótidos, los cuales están organizados a lo largo de los genomas de la mayoría de las especies eucariotas (Pokhriyal *et al.*, 2012).

En la actualidad los SSR según lo señala Jonah *et al.*, (2011) son los marcadores utilizados más ampliamente por los investigadores de maíz, gracias a su disponibilidad en gran número en el dominio público además de su simplicidad y efectividad.

Como recurso de consulta existen diferentes organizaciones que permiten conocer los avances, nuevos modelos y algunas propuestas de investigadores en el mejoramiento del maíz que siempre tienen datos actualizados, por ejemplo Maize CrDB; <http://www.maizegdb.org>.

El principio básico de los SSR como marcadores moleculares es que el número de repeticiones en tándem es altamente variable entre individuos y especies y que las secuencias que flanquean las repeticiones aleatorias son altamente conservadas (Chen *et al.*, 2005).

Los microsatélites han sido clasificados de manera variada dependiendo de su tamaño, tipo de unidad de repetición y ubicación en el genoma. Dependiendo del número de nucleótidos por unidad de repetición los SSR han sido clasificados como mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, o hexanucleotidos (Kalia, *et al.* 2011).

Ejemplos de unidades de repetición de microsatélites:

- AAAAAAAAAAAA = (A)11 = mononucleótido (11 pb)
- GTGTGTGTGTGT = (GT)6 = dinucleótido (12 pb)
- CTGCTGCTGCTG = (CTG)4 = trinucleótido (12 pb)

- ACTCACTCACTCACTC = (ACTC)₄ = tetranucleótido (16 pb)

Los SSR o microsatélites, tal como lo propone Tiessen (2012), se han utilizado para comparar la estructura genética de poblaciones de cultivos, como lo son maíz, frijol, cereales y pastos. Son una amplia herramienta para estudios de población genética, determinación de paternidad y verificación de la identidad genética (Haan, 2013).

Desde la década de los 90, los SSR han sido utilizados ampliamente en la construcción de mapas de ligamiento genético, mapeo de QTL (Qualitative trait loci), selección asistida por marcadores y análisis de germoplasma en plantas. En el genoma de maíz, la abundancia de los microsatélites es elevada, sus polimorfismos son múltiples y su distribución es más o menos uniforme a lo largo de los cromosomas. En muchas especies se han desarrollado una gran cantidad de SSR y están disponibles para los mejoradores.

2.15. Marcador molecular ISSR

ISSR (Inter simple sequence repeat) es una técnica basada en la PCR, la cual lleva a cabo la amplificación de un segmento de ADN, presente en medio de dos regiones idénticas de repeticiones de microsatélites orientadas en una dirección opuesta entre sí (Pradeep R. *et al.*, 2002).

Los ISSR pertenecen a un tipo de marcadores multi-locus, en su mayoría dominantes que también incluyen a los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) y sus derivados. Los marcadores dominantes no permiten una distinción clara entre homocigotos y heterocigotos. Estos marcadores, sin embargo, usualmente producen múltiples fragmentos de ADN (cada uno de los cuales son considerados como un locus) en una reacción individual, permitiendo la generación de un gran número de loci a lo largo del genoma de cualquier especie, sin la necesidad de conocer previamente las secuencias de ADN de las regiones objetivo, este caso se presenta en la mayoría de los cultivos tradicionales como el maíz, el frijol, el sorgo, entre otros (Ng y Tan, 2015).

Para la visualización de los ISSR, (Eguiarte *et al.*, 2007), se emplea la técnica de electroforesis. Los dos métodos que se utilizan en la electroforesis de ISSR son: a) gel de agarosa visualizado con bromuro de etidio, y b) geles de acrilamida tenidos con nitrato de plata. Las bandas que se obtienen con este marcador van de 100 a 2000 pb. La variación alélica en los ISSR consiste de la presencia o ausencia de los productos amplificados.

2.16. Definición de polimorfismo

Como se mencionó anteriormente una de las características más importantes de los marcadores moleculares es su nivel de polimorfismo, el cual es un cambio localizado en una secuencia específica de ADN dentro de un genoma que ocurre generalmente por deleciones, inversiones, inserciones o re-arreglos. Estas mutaciones permiten la existencia de diferentes alelos para un locus específico. En el caso del ADN repetido, las variaciones en el número de repeticiones pueden dar lugar a una longitud diferente en los fragmentos de restricción, lo que los hace polimórficos.

De acuerdo a Sukhumsirichart (2018), la variación en la secuencia de ADN o polimorfismo, puede tener efecto en una diferencia individual, diferencias en el fenotipo, el riesgo de ser propenso a diversas enfermedades y la respuesta a medicamentos o vacunas. Los polimorfismos ocurren comúnmente en la naturaleza y están relacionados con la biodiversidad, la variación genética y la adaptación.

Se puede denominar polimorfismo a la presencia simultánea en una población de genomas que muestran variaciones alélicas. En otras palabras es la existencia en una población de múltiples alelos de un gen. Es decir, un polimorfismo es la variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre individuos de una población. Existen varios tipos de polimorfismo, el polimorfismo de nucleótido simple o SNP (single nucleotide polymorphism), los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción o RFLP (restriction fragment length polymorphism) y los polimorfismos en el número de repetición en tándem o VNTR (variable number tandem repetition) (Mena-Mungia y Lepiz-Ildefonso, 2017)

Los polimorfismos se presentan más frecuentemente dentro de una población que las mutaciones (frecuencia $\geq 1\%$). El tipo de polimorfismo más frecuente es el polimorfismo de nucleótido simple (SNP) el cual es un cambio individual en la base de una secuencia de ADN que ocurre en una posición específica en el genoma (Sukhumsirichart, 2018).

Tipo de dominancia

Los marcadores moleculares pueden ser clasificados de acuerdo a su tipo de dominancia en marcadores dominantes y marcadores codominantes. Los marcadores codominantes indican en primer lugar, diferencias en tamaño de los fragmentos, basándose en la distancia de migración del mismo en los geles de separación. La presencia de una banda presupone la amplificación de un locus; mientras que los marcadores dominantes detectan el polimorfismo existente en las muestras analizadas basándose en la presencia o ausencia de las bandas o fragmentos, éstos detectan muchos loci simultáneamente. Los marcadores codominantes pueden tener diferentes alelos mientras que un marcador dominante solo tiene dos. Los marcadores codominantes pueden discriminar claramente entre homocigotos y heterocigotos (Collard *et al.*, 2005).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. 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 Filogenéticos, Departamento de Producción Agrícola y en el municipio de Sayula, Jalisco, México. En un lote de 200 metros cuadrados dentro del rancho El mezquital, 19°54'48.6"N 103°36'37.7"W

Descripción del sitio de estudio

El municipio de Sayula tiene una superficie de 287 Kilómetros cuadrados, se encuentra a una altura de 1,365 msnm, La mayor parte del municipio de Sayula (69.9%) tiene clima semicálido semihúmedo. La temperatura media anual es de 18.6°C, mientras que sus máximas y mínimas promedio oscilan entre 29.6°C y 7.2°C respectivamente. La precipitación media anual es de 928 mm, La agricultura (37.9%) es el uso de suelo dominante en el municipio. (IEEG, 2018).

3.2. Material genético

Selección de material genético

Se seleccionaron las líneas puras 1023 (Línea A), 1055 (Línea B), 21003 (línea C) y 21102 (Línea D), cada una con dos categorías (categoría original expresada como I y categoría registrada expresada como II), utilizadas como líneas parentales para la producción de híbridos simples y trilineales, obtenidas del banco de germoplasma propiedad de la empresa Novasem Innovaciones S.A. de C.V., estas líneas puras fueron seleccionadas por su importancia en la producción de híbridos. Las líneas parentales seleccionadas no tienen un origen genético en común.

Para la extracción de ADN el primer paso consistió en sembrar 50 semillas de cada categoría para cada línea parental en condiciones de invernadero, se utilizó un sustrato a base de peat moss, 25 días después de la siembra en invernadero se cosecharon las plántulas, se etiquetaron y fueron almacenadas a una temperatura de -20° C hasta la extracción de ADN.

3.3. Caracterización morfológica

Se realizó una caracterización basada en las características morfológicas descritas en la guía técnica para la descripción varietal de maíz (SNICS 2014), a las cuatro líneas parentales, cada una con las categorías de semilla original y registrada. La caracterización de acuerdo al SNICS se define como el conjunto de observaciones que permiten distinguir a una población de plantas que constituyen una variedad vegetal.

En la guía para la descripción varietal se clasifican a los caracteres morfológicos en:

- QN: Caracteres cuantitativos
- QL: Caracteres cualitativos
- PQ: Caracteres pseudo-cualitativos

A todas las características cualitativas evaluadas se les otorgo un valor numerico entre 1 y 9 de acuerdo a la guía de caracterización varietal del maíz.

Siembra de líneas parentales de maíz



Figura 2. Aplicación de tratamiento químico a la semilla.



Figura 3. Siembra de las líneas parentales.

Establecimiento del experimento

Se prepararon 8 sobres con 100 semillas para cada línea parental y categoría de semilla, previamente a la siembra se aplicó un tratamiento químico a la semilla el cual consiste en fungicida, insecticida, polímero y colorante a una dosis de 12 ml de tratamiento por kilogramo de semilla, la dosis se ajustó a la cantidad de semillas por sobre. La siembra se realizó en el mes de junio de 2018 en el municipio de Sayula, Jalisco, México, en el rancho el mezquital, en un lote de 200 metros cuadrados. Cada línea parental se sembró en 8 surcos (cuatro surcos por cada categoría de semilla) con un total de 32 surcos de 10 metros de longitud cada uno, la semilla se sembró a una profundidad de 5 centímetros y a una distancia de 8 centímetros entre cada semilla.

La siembra se realizó de manera manual y el manejo agronómico del cultivo se realizó de acuerdo a los protocolos establecidos en la empresa Novasem Innovaciones para las líneas parentales.

Cuadro 3. Características morfológicas en primera hoja y hoja evaluadas en campo para cuatro líneas parentales de maíz con dos categorías

Tipo de características	Características evaluadas
Primera hoja	Coloración de la vaina por antocianinas Longitud (cm) Ancho (cm) Relación Largo/Ancho Forma de la Punta
Hoja	Ángulo de inserción de las hojas abajo de la mazorca superior Ángulo entre la lámina y el tallo Ángulo de inserción de las hojas por arriba de la mazorca superior. Forma característica Ondulación del margen laminar. Presencia de arrugas longitudinales. Coloración de la lámina. Coloración de la vaina en las tres primeras hojas de la base del tallo. Coloración por antocianinas en la vaina, en la parte media de la planta. Coloración de la vaina en la hoja de la mazorca principal. Coloración de la aurícula. Pubescencia sobre el margen de la vaina. Ancho de lámina (cm)

* Características cualitativas evaluadas se les otorgo un valor numérico entre 1 y 9 de acuerdo a la guía de caracterización varietal del maíz.

Cuadro 4. Características morfológicas en tallo y espiga evaluadas en campo para cuatro líneas parentales de maíz con dos categorías

Tipo de características	Características evaluadas
Tallo	Coloración por antocianinas en raíces adventicias Número de hijuelos por planta Longitud media de entre nudos inferiores (cm) Diámetro medio en la parte media del entrenudo de la mazorca superior (mm) Longitud media de entre nudos superiores (cm) Grado de zigzagueo Coloración por antocianinas en nudos
Espiga	Longitud del pedúnculo (cm) Longitud (cm) Longitud del eje principal (cm) Angulo Posición de ramas laterales Número de ramas laterales primarias Ramas secundarias Densidad de espiguillas Coloración por antocianinas en las glumas Coloración por antocianinas en las anteras Longitud de ramas laterales (cm)

* características cualitativas evaluadas se les otorgo un valor numérico entre 1 y 9 de acuerdo a la guía de caracterización varietal del maíz.

Cuadro 5. Características morfológicas en jilote, planta y mazorca, evaluadas en campo para cuatro líneas parentales de maíz con dos categorías

Tipo de características	Características evaluadas
Jilote	Coloración por antocianinas en los estigmas Intensidad de la coloración por antocianinas
Planta	Longitud (cm) Altura de la mazorca (cm) Relación entre la altura la mazorca superior y altura de la planta Número de mazorcas por planta
Mazorca	Longitud del pedúnculo (cm) Longitud (cm) Diámetro (mm) Forma Arreglo de hileras de granos Número de hileras de granos Número de granos por hilera Forma de la corona del grano Color del grano (Apariencia externa sin desgranar) Coloración por antocianinas en las glumas Coloración por antocianinas en las anteras Longitud de ramas laterales (cm)

* Características cualitativas evaluadas se les otorgo un valor numérico entre 1 y 9 de acuerdo a la guía de caracterización varietal del maíz.



Figura 4. Características evaluadas en la hoja: a) Hoja: Ancho de lámina., b) Coloración de la lámina, c) Ángulo de inserción de las hojas por arriba de la mazorca superior.



Figura 5. Características evaluadas en el tallo: Coloración por antocianinas en nudos y diámetro en la parte media del entrenudo de la mazorca superior (mm).



Figura 6. Características evaluadas en espiga: Coloración por antocianinas en las anteras y ángulo.



Figura 7. Evaluación de características: Intensidad de la coloración por antocianinas y altura de planta.

Cosecha de mazorcas para caracterización morfológica

Se cosecharon un total de 480 mazorcas (60 mazorcas correspondientes a cada categoría de cada línea parental) y fueron etiquetadas con un número de identificación. Las mazorcas cosechadas contenían una humedad promedio de 25% por lo cual fueron secadas en las instalaciones de la empresa Novasem Innovaciones, el proceso de secado consistió en depositar las mazorcas en celdas de secado donde fueron sometidas a un flujo de aire constante a una temperatura de secado no mayor a los 30 grados centígrados. Una vez que la humedad promedio de cada línea parental se redujo al 13% las mazorcas fueron fumigadas con pastillas de fosforo de aluminio, con una dosis de 3 pastillas por metro cubico.

Descripción de las características morfológicas evaluadas en mazorca:

- Longitud del pedúnculo: Distancia comprendida desde el nudo de inserción en el tallo hasta la base de la mazorca superior (cm).
- Longitud: Distancia comprendida desde la base hasta el ápice de la mazorca superior (cm).
- Diámetro: Se mide en centímetros en la parte media de la mazorca superior.
- Forma; y arreglo de hileras de granos; La observación se realiza en la mazorca superior.
- Número de hileras de granos: Se cuenta el número de hileras de granos en la parte media de la mazorca superior.
- Número de granos por hilera: Numero de granos, por hilera, de la mazorca superior, desde la base hasta el ápice.
- Tipo de grano; y forma de la corona del grano: La observación se realiza en el tercio central de la mazorca superior.
- Color del grano: La observación se refiere a la apariencia externa de la mazorca superior.
- Color dorsal del grano: El color se observa en el lado opuesto a la posición del embrión, en la parte media de la mazorca superior.
- Color del endospermo del grano: Se debe hacer un corte transversal del grano para efectuar esta observación.

- Coloración por antocianinas en las glumas del olote e intensidad de la coloración por antocianinas en las glumas del olote



Figura 8. Características morfológicas evaluadas en mazorca, longitud de pedúnculo.



Figura 9. Características morfológicas evaluadas en mazorca, arreglo de hileras de granos.

3.4. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó de acuerdo a el protocolo de propuesto por Saghai-Marooif *et al.*, 1984, (utilizando tejido foliar de las plántulas obtenidas del invernadero). 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%, β -mercaptoethanol 1% y bisulfito de sodio 1%). Se incubó en baño maría a 60°C durante 30 minutos 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 concentración del ADN genómico extraído se evaluó mediante espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa al 1%, (Saghai-Marooif *et al.*, 1984).

3.5. Marcador molecular ISSR

Para la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa se utilizaron 5 iniciadores para el marcador ISSR, a continuación se presentan los primers utilizados en este estudio y su respectiva secuencia 5'-3':

- JOHN (AGA GAG AGA GAG AGYC)
- 812 (GAG AGA GAG AGA GAG AA)
- MANNY ((CAC)₄ RC))
- MAO ((CTC)₄ RC))
- 898 (CAC ACA CAC ACA RY).

* Y = C o T, R = A o G

La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L (amortiguador de PCR 1X, MgCl₂ 2.5 mM, iniciador 0.8 μ M, dNTPs 0.25 mM, Taq pol. 0.05 U y DNA 10 ng/ μ L). para el marcador ISSR El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, alineación a 53°C durante 1 min, extensión a 72°C durante 2 min y una

extensión final a 72°C durante 7 min. Temperatura final 4°C. Los fragmentos amplificados se separaron en geles de agarosa de alta resolución al 1.2% en TBE 1X durante 1 h a 100 V y se tiñeron con bromuro de etidio.

3.6. Marcador SSR

Se utilizaron diez iniciadores para SSR con ubicación en cada uno de los cromosomas del maíz. La PCR para este marcador se realizó con una mezcla de reacción con la siguiente composición: amortiguador PCR 1X, MgCl₂ 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 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.

Cuadro 6. Primers utilizados para el marcador SSR

Primer	Cromosoma y bin	Sentido	Antisentido
phi120	1.11	GACTCTCACGGCGAGGTATGA	TGATGTCCCAGCTCTGAACTGAC
phi96100	2.01	AGGAGGACCCCAACTCCTG	TTGCACGAGCCATCGTAT
phi099	3.04	TACAAAAATCAGGACTGCGAAAAACCCAA	GTCGGTGTGTGATCCTTCCAC
phi076	4.11	TTCTTCCGCGGCTTCAATTTGACC	GCATCAGGACCCGCAGAGTC
phi0109188	5.03	AAGCTCAGAAGCCGGAGC	GGTCATCAAGCTCTCTGATCG
phi15987	6.08	GATGGGCCCTAGACCAGCTT	GCCTCTCCCATCTCT
phi034	7.02	TAGCGACAGGATGGCCTCTTCT	GGGGAGCACGCCTTCGTTCT
phi121	8.03	AGGAAAATGGAGCCGGTGAACCA	TTGGTCTGGACCAAGCACATACAC
phi032	9.04	CTCCAGCAAGTGATGCGTGAC	GACACCCGGATCAATGATGGAAC
phi96432	10.02	GTAATCCCACGTCCTATCAGCC	TCCAACCTGAACGAACTCCTC

3.7. Análisis estadístico

Se obtuvieron los promedios de las variables morfológicas medidas en campo, con los cuales se realizó una comparación entre las categorías I y II de cada línea, asumiendo que en las diferencias = 0 las líneas no muestran modificación. En los datos observados con una diferencia grande entre los promedios de las dos categorías se realizó una prueba de T para comprobar significancia estadística en la diferencia.

A partir de la matriz de datos morfológicos se realizó un análisis de componentes principales mediante el software NTSYSpc versión 2.21. Los resultados se muestran en una gráfica biplot.

Los datos moleculares se obtuvieron a partir de los geles de agarosa de alta resolución, cuya lectura permitió elaborar matrices binarias de presencia y ausencia, calcular el porcentaje de loci polimórfico y el análisis de similitud entre individuos (coeficiente de Jaccard), para posteriormente realizar el análisis de agrupamiento por el método de Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages (UPGMA) contenido en el programa NTSYSpc versión 2.21h, reportando los resultados de manera gráfica en un dendrograma.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Características morfológicas

El resultado del análisis morfológico para las variables medidas, pone en evidencia las diferencias encontradas en cada línea y entre las líneas. Los promedios de las variables medidas se muestran en los Cuadros del anexo

Al calcular las diferencias entre los promedios que se obtuvieron para cada categoría de las líneas, se observó que en promedio, los valores de las variables medidas mantuvieron la semejanza en todas las líneas, obteniendo en algunos casos, diferencia = 0 lo que significa igualdad de medias. Sin embargo, se seleccionaron las variables que presentaban diferencias mayores según la variable y se realizaron pruebas de T para verificar la significancia de las diferencias. Las variables seleccionadas para la aplicación de la prueba de T por las diferencias encontradas se reportan en los siguientes cuadros.

Cuadro 7. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de hoja y tallo en las dos categorías de la Línea A.

Características	AI	AII	Diferencia	Prueba de T P<0.05
Primera hoja: Coloración de la vaina por antocianinas	6.4	6.267	0.133	
Primera hoja: Longitud (cm)	4.967	4.933	0.034	
Primera hoja : Ancho (cm)	1.657	1.58	0.077	
Primera hoja : Relación Largo/Ancho	3.023	3.136	-0.113	
Primera hoja : Forma de la Punta	3.033	2.9	0.133	
Hoja: Ángulo de inserción de las hojas abajo de la mazorca superior	2	2	0	
Hoja: Ángulo entre la lámina y el tallo	3	3	0	
Hoja: Ángulo de inserción de las hojas por arriba de la mazorca superior.	1	1	0	
Hoja: Forma característica	1	1	0	
Hoja: Ondulación del margen laminar.	2.233	2.233	0	
Tallo: Coloración por antocianinas en raíces adventicias.	1	1	0	

Tallo: Número de hijuelos por planta.	1	1	0	
Tallo: Longitud media de entrenudos inferiores.	12.307	9.581	2.726	0.026832*
Tallo: Diámetro. Medio en la parte media del entrenudo de la mazorca superior (mm)	14.5	12.82	1.68	0.15988 ns
Tallo: Longitud media de entrenudos superiores.	11.342	11.091	0.251	
Tallo: Grado de zigzagado.	3.4	3.333	0.067	
Tallo: Coloración por antocianinas en nudos.	1	1	0	
Hoja: Presencia de arrugas longitudinales.	1	1	0	
Hoja: Coloración de la lámina.	2	2	0	
Hoja: Coloración de la vaina en las tres primeras hojas de la base del tallo.	2	2	0	
Hoja: Coloración por antocianinas en la vaina, en la parte media de la planta.	1	1	0	
Hoja: Coloración de la vaina en la hoja de la mazorca principal.	2	2	0	
Hoja: Coloración de la aurícula.	3	3	0	
Hoja: Pubescencia sobre el margen de la vaina.	1	1	0	

*Significativa a $P < 0.05$; ns= no significativo

Cuadro 8. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de espiga en las dos categorías de la Línea A.

CARACTERÍSTICAS	AI	AII	Diferencia	Prueba de T P<0.05
Espiga: Longitud del pedúnculo (cm)	7.223	7.693	-0.47	ns
Espiga: Longitud.	29.24	29.953	-0.713	ns
Espiga: Longitud del eje principal.	21.343	21.753	-0.41	ns
Espiga: Ángulo.	1.333	1.467	-0.134	ns
Espiga: Posición de ramas laterales.	1	1	0	ns
Espiga: Número de ramas laterales primarias.	4.667	4.133	0.534	ns
Espiga: Ramas Secundarias.	1.533	1.267	0.266	ns
Espiga: Densidad de espiguillas.	5.8	6.2	-0.4	ns
Espiga: Coloración por antocianinas en las glumas.	1	1	0	ns
Espiga: Coloración por antocianinas en las anteras.	1	1	0	ns
Jilote: Coloración por antocianinas en los estigmas.	1.267	1	0.267	ns
Jilote: Intensidad de la coloración por antocianinas.	1.067	1	0.067	ns
Espiga: Longitud de ramas laterales. (cm)	18.99	19.86	-0.87	ns

ns= no significativo

Los resultados para la línea A presentados en el Cuadro 7 presentan significancia para la característica de longitud de entrenudos inferiores, además se presentan diferencias numéricas para caracteres de la primera hoja, en la longitud media de entrenudos superiores y el grado de zigzagueo de entrenudos. Además los caracteres cualitativos no fueron significativos. Para los caracteres de espiga no hubo diferencias significativas (Cuadro 8).

Cuadro 9. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de mazorca en las dos categorías de la Línea A.

Características	AI	AII	Diferencia	Prueba de T
Planta: Altura de la mazorca.	74	63.633	10.367	4.065E-08**
Planta: Relación entre la altura la mazorca superior y altura de la planta	0.349	0.324	0.025	
Hoja: Ancho de lámina.	10.703	10.537	0.166	
Planta: Número de mazorcas por planta.	2.267	1.9	0.367	
Mazorca: Longitud del pedúnculo.	11.922	10.882	1.04	4.11701E-44**
Mazorca: Longitud.	11.592	11.514	0.078	
Mazorca: Diámetro.	40.012	41.084	-1.072	
Mazorca: Forma.	2.44	2.46	-0.02	
Mazorca: Arreglo de hileras de granos.	1.12	1.24	-0.12	
Mazorca: Número de hileras de granos.	12.88	13	-0.12	
Mazorca: Número de granos por hilera.	23.48	24.02	-0.54	
Mazorca: Forma de la corona del grano.	2	2	0	
Mazorca: Color del grano. (Apariencia externa sin desgranar)	2	2	0	

**Altamente significativa a $P < 0.0$

De acuerdo a los resultados presentados en el cuadro 9, para caracteres cuantitativos de mazorca en la línea A, existen diferencias significativas para: altura de mazorca y longitud del pedúnculo. No fueron significativos o iguales a cero los caracteres de grano, sin embargo con diferencias numéricas se presentaron los caracteres cuantitativos de mazorca longitud, diámetro y forma de la mazorca, arreglo de las hileras, número de hileras en la mazorca y número de granos por hilera, así como la relación de altura de mazorca superior y la altura de planta, ancho de lámina y número de mazorcas por planta.

Cuadro 10. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de hoja y tallo en las dos categorías de la Línea B.

Características	BI	BII	DIFERENCIA	Prueba de T P<0.05
Primera hoja: Coloración de la vaina por antocianinas	5	5.533	-0.533	
Primera hoja: Longitud (cm)	6.267	6.067	0.2	
Primera hoja : Ancho (cm)	3.767	3.767	0	
Primera hoja : Relación Largo/Ancho	1.681	1.622	0.059	
Primera hoja : Forma de la Punta	2.9	2.867	0.033	
Hoja: Ángulo de inserción de las hojas abajo de la mazorca superior	1.8	1.867	-0.067	
Hoja: Ángulo entre la lámina y el tallo	3	3	0	
Hoja: Ángulo de inserción de las hojas por arriba de la mazorca superior.	1	1	0	
Hoja: Forma característica	3	3.067	-0.067	
Hoja: Ondulación del margen laminar.	2.1	2.2	-0.1	
Tallo: Coloración por antocianinas en raíces adventicias.	9	8.667	0.333	
Tallo: Número de hijuelos por planta.	1	1	0	
Tallo: Longitud media de entrenudos inferiores.	10.671	11.094	-0.423	
Tallo: Diámetro. Medio en la parte media del entrenudo de la mazorca superior (mm)	12.367	12.807	-0.44	
Tallo: Longitud media de entrenudos superiores.	11.153	10.377	0.776	0.000121287
Tallo: Grado de zigzagado.	3.4	3.4	0	
Tallo: Coloración por antocianinas en nudos.	4.4	3.467	0.933	4.21452E-08
Hoja: Presencia de arrugas longitudinales.	1	1	0	
Hoja: Coloración de la lámina.	2	2	0	
Hoja: Coloración de la vaina en las tres primeras hojas de la base del tallo.	4.633	4.233	0.4	
Hoja: Coloración por antocianinas en la vaina, en la parte media de la planta.	3.167	3.6	-0.433	
Hoja: Coloración de la vaina en la hoja de la mazorca principal.	2	2	0	
Hoja: Coloración de la aurícula.	3	3	0	
Hoja: Pubescencia sobre el margen de la vaina.	1	3	-2	

Cuadro 11. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de espiga en las dos categorías de la Línea B

Características	BI	BII	DIFERENCIA	Prueba de T P<0.05
Espiga: Longitud del pedúnculo (cm)	15.557	13.173	2.384	6.38317E-05
Espiga: Longitud.	28.533	32.703	-4.17	9.40924E-13
Espiga: Longitud del eje principal.	25.657	28.61	-2.953	
Espiga: Ángulo.	1.467	1.333	0.134	
Espiga: Posición de ramas laterales.	1.067	1	0.067	
Espiga: Número de ramas laterales primarias.	3.633	3.767	-0.134	
Espiga: Ramas Secundarias.	1.8	2.867	-1.067	0.000378844
Espiga: Densidad de espiguillas.	1.4	6.8	-5.4	
Espiga: Coloración por antocianinas en las glumas.	9	9	0	
Espiga: Coloración por antocianinas en las anteras.	9	8.867	0.133	
Jilote: Coloración por antocianinas en los estigmas.	9	9	0	
Jilote: Intensidad de la coloración por antocianinas.	9	8.933	0.067	
Espiga: Longitud de ramas laterales. (cm)	10.39	11.92	-1.53	0.007765332

Los resultados para espiga en la línea B se presentan en el Cuadro 11, en donde caracteres cuantitativos como: longitud del pedúnculo, longitud espiga, longitud del eje principal, ramas secundarias y longitud de ramas laterales fueron significativos, coloración por antocianinas en las glumas y coloración por antocianinas en los estigmas fueron no significativos o exactamente iguales y los caracteres cuantitativos, ángulo de la espiga, posición de ramas laterales número de ramas laterales primarias, densidad de espiguillas y los cualitativos, coloración por antocianinas en las anteras y la intensidad de la coloración por antocianinas presentaron diferencias numéricas.

Cuadro 12. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de mazorca en las dos categorías de la Línea B

CARACTERÍSTICAS	BI	BII	DIFERENCIA	Prueba de T P<0.05
Planta: Altura de la mazorca.	82.567	86.400	-3.833	0.049330025
Planta: Relación entre la altura la mazorca superior y altura de la planta	0.391	0.410	-0.019	
Hoja: Ancho de lámina.	7.550	7.667	-0.117	
Planta: Número de mazorcas por planta.	1.033	1.000	0.033	
Mazorca: Longitud del pedúnculo.	8.834	9.852	-1.018	0.008404495
Mazorca: Longitud.	12.808	15.156	-2.348	0.00766593
Mazorca: Diámetro.	43.334	51.644	-8.310	0.144147229
Mazorca: Forma.	2.720	2.780	-0.060	
Mazorca: Arreglo de hileras de granos.	1.560	1.820	-0.260	
Mazorca: Número de hileras de granos.	46.080	14.820	31.260	
Mazorca: Número de granos por hilera.	25.260	28.300	-3.040	
Mazorca: Forma de la corona del grano.	1.000	1.000	0.000	
Mazorca: Color del grano. (Apariencia externa sin desgranar)	2.000	2.000	0.000	

Los resultados para caracteres de mazorca, de la línea B, presentan diferencias significativas en altura de mazorca, longitud del pedúnculo, longitud de mazorca y diámetro de mazorca y no significativos o iguales genéticamente en forma de la corona del grano, color de grano y diferencias numéricas en el resto de caracteres cuantitativos de mazorca (Cuadro 12).

Cuadro 13. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de hoja y tallo en las dos categorías de la Línea C.

Características	CI	CII	DIFERENCIA	Prueba de T P<0.05
Primera hoja: Coloración de la vaina por antocianinas	4.571	4.125	0.446	
Primera hoja: Longitud (cm)	5.186	5.156	0.03	
Primera hoja : Ancho (cm)	1.6	1.453	0.147	
Primera hoja : Relación Largo/Ancho	3.285	3.604	-0.319	
Primera hoja : Forma de la Punta	2.714	2.438	0.276	
Hoja: Ángulo de inserción de las hojas abajo de la mazorca superior	1	1	0	
Hoja: Ángulo entre la lámina y el tallo	3	3	0	
Hoja: Ángulo de inserción de las hojas por arriba de la mazorca superior.	1	1	0	
Hoja: Forma característica	3	3	0	
Hoja: Ondulación del margen laminar.	2.071	2.094	-0.023	
Tallo: Coloración por antocianinas en raíces adventicias.	1	1	0	
Tallo: Número de hijuelos por planta.	1	1	0	
Tallo: Longitud media de entrenudos inferiores.	12.477	12.73 8	-0.261	
Tallo: Diámetro. Medio en la parte media del entrenudo de la mazorca superior (mm)	13.082	12.99 1	0.091	
Tallo: Longitud media de entrenudos superiores.	11.163	10.23 6	0.927	7.405E-05
Tallo: Grado de zigzaguo.	3.5	3.438	0.062	
Tallo: Coloración por antocianinas en nudos.	1	1	0	
Hoja: Presencia de arrugas longitudinales.	1	1	0	
Hoja: Coloración de la lámina.	2	2	0	
Hoja: Coloración de la vaina en las tres primeras hojas de la base del tallo.	2.357	2.438	-0.081	
Hoja: Coloración por antocianinas en la vaina, en la parte media de la planta.	1	1	0	
Hoja: Coloración de la vaina en la hoja de la mazorca principal.	2	2	0	
Hoja: Coloración de la aurícula.	2	2	0	
Hoja: Pubescencia sobre el margen de la vaina.	1	1	0	

Cuadro 14. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de espiga en las dos categorías de la Línea C

CARACTERÍSTICAS	CI	CII	DIFERENCIA	Prueba de T P<0.05
Espiga: Longitud del pedúnculo (cm)	8.075	7.725	0.35	
Espiga: Longitud.	31.561	33.581	-2.02	0.00873413
Espiga: Longitud del eje principal.	27.979	29.209	-1.23	0.002465639
Espiga: Ángulo.	1	1	0	
Espiga: Posición de ramas laterales.	1	1	0	
Espiga: Número de ramas laterales primarias.	2.214	2.281	-0.067	
Espiga: Ramas Secundarias.	3.571	6.25	-2.679	3.31162E-31
Espiga: Densidad de espiquillas.	6.5	6.438	0.062	
Espiga: Coloración por antocianinas en las glumas.	1	1	0	
Espiga: Coloración por antocianinas en las anteras.	1	1	0	
Jilote: Coloración por antocianinas en los estigmas.	1	1	0	
Jilote: Intensidad de la coloración por antocianinas.	1	1	0	
Espiga: Longitud de ramas laterales. (cm)	20.521	22	-1.479	0.001501892

Para los caracteres de espiga para la línea C se encontraron diferencias significativas para longitud de espiga, longitud del eje principal, ramas secundarias y longitud de ramas laterales. Se presentaron caracteres no significativos o iguales a cero: ángulo de la espiga, posición de las ramas laterales, coloración por antocianinas en las glumas, en las anteras, en los estigmas e intensidad de la coloración por antocianinas en la espiga y con diferencias numéricas: longitud del pedúnculo, número de ramas laterales primarias y densidad de espiquilla (Cuadro 14). Los resultados de caracteres de mazorca de la línea C fueron significativos para altura de mazorca y no significativos para color de grano, el resto de caracteres presentaron diferencias numéricas tanto para caracteres cualitativos como cuantitativos, como se describen en el cuadro 15.

Cuadro 15. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de mazorca en las dos categorías de la Línea C

Características	CI	CII	DIFERENCIA	Prueba de T P<0.05
Planta: Altura de la mazorca.	90.10 7	91.40 6	-1.299	0.157011273
Planta: Relación entre la altura la mazorca superior y altura de la planta	0.414	0.428	-0.014	
Hoja: Ancho de lámina.	8.504	8.181	0.322	
Planta: Número de mazorcas por planta.	1.200	1.200	0.000	
Mazorca: Longitud del pedúnculo.	6.524	7.164	-0.640	
Mazorca: Longitud.	12.65 8	13.16 2	-0.504	
Mazorca: Diámetro.	43.99 4	43.80 2	0.192	
Mazorca: Forma.	2.580	2.300	0.280	
Mazorca: Arreglo de hileras de granos.	2.360	2.760	-0.400	
Mazorca: Número de hileras de granos.	13.92 0	13.96 0	-0.040	
Mazorca: Número de granos por hilera.	22.10 0	23.50 0	-1.400	
Mazorca: Forma de la corona del grano.	1.000	1.520	-0.520	
Mazorca: Color del grano. (Apariencia externa sin desgranar)	2.000	2.000	0.000	

Cuadro 16. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de hoja y tallo en las dos categorías de la Línea D.

CARACTERÍSTICAS	DI	DII	DIFERENCIA	Prueba de T P<0.05
Primera hoja: Coloración de la vaina por antocianinas	6.933	7	-0.067	
Primera hoja: Longitud (cm)	4.437	4.85	-0.413	
Primera hoja : Ancho (cm)	1.52	1.48	0.04	
Primera hoja : Relación Largo/Ancho	3.116	3.298	-0.182	
Primera hoja : Forma de la Punta	2.333	2.133	0.2	
Hoja: Ángulo de inserción de las hojas abajo de la mazorca superior	1.067	1.033	0.034	
Hoja: Ángulo entre la lámina y el tallo	3	3	0	
Hoja: Ángulo de inserción de las hojas por arriba de la mazorca superior.	1	1	0	
Hoja: Forma característica	1.333	3	-1.667	2.33901E-38
Hoja: Ondulación del margen laminar.	2.167	2.4	-0.233	
Tallo: Coloración por antocianinas en raíces adventicias.	1.133	1	0.133	
Tallo: Número de hijuelos por planta.	1	1	0	
Tallo: Longitud media de entrenudos inferiores.	13.925	13.196	0.729	
Tallo: Diámetro. Medio en la parte media del entrenudo de la mazorca superior (mm)	15.363	12.953	2.41	
Tallo: Longitud media de entrenudos superiores.	11.743	11.828	-0.085	
Tallo: Grado de zigzagueo.	3	3	0	
Tallo: Coloración por antocianinas en nudos.	1.2	1	0.2	
Hoja: Presencia de arrugas longitudinales.	1	1	0	
Hoja: Coloración de la lámina.	2.1	2	0.1	
Hoja: Coloración de la vaina en las tres primeras hojas de la base del tallo.	1.967	2	-0.033	
Hoja: Coloración por antocianinas en la vaina, en la parte media de la planta.	1.1	1	0.1	
Hoja: Coloración de la vaina en la hoja de la mazorca principal.	1.133	1.067	0.066	
Hoja: Coloración de la aurícula.	2.367	3	-0.633	
Hoja: Pubescencia sobre el margen de la vaina.	2.4	1.4	1	

Cuadro 17. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de espiga en las dos categorías de la Línea D

CARACTERÍSTICAS	DI	DII	DIFERENCIA	Prueba de T P<0.05
Espiga: Longitud del pedúnculo (cm)	11.2	11.397	-0.197	
Espiga: Longitud.	25.41	25.627	-0.217	
Espiga: Longitud del eje principal.	20.999	21.713	-0.714	
Espiga: Ángulo.	2.867	2.933	-0.066	
Espiga: Posición de ramas laterales.	1	1.133	-0.133	
Espiga: Número de ramas laterales primarias.	1.533	1.4	0.133	
Espiga: Ramas Secundarias.	1	1	0	
Espiga: Densidad de espiguillas.	7	7	0	
Espiga: Coloración por antocianinas en las glumas.	1	1	0	
Espiga: Coloración por antocianinas en las anteras.	1.267	1.067	0.2	
Jilote: Coloración por antocianinas en los estigmas.	9	9	0	
Jilote: Intensidad de la coloración por antocianinas.	1.267	2.2	-0.933	7.11422E-09
Espiga: Longitud de ramas laterales. (cm)	12.8	13.12	-0.32	

Para los resultados de la línea D en los caracteres de hoja y tallo se presentaron diferencias significativas en forma característica de la hoja y no significativas para las características ángulo entre la lámina y el tallo, ángulo de inserción de las hojas por arriba de la mazorca superior, número de hijuelos por planta, grado de zigzagado y presencia de arrugas longitudinales (Cuadro 16).

Para caracteres de espiga mostrados en el cuadro 17, el carácter con significancia fue intensidad de la coloración por antocianinas y no significativos o iguales a cero: ramas secundarias, densidad de espiguillas, coloración por antocianinas en las glumas, coloración por antocianinas en los estigmas.

Cuadro 18. Diferencia entre los promedios obtenidos para características de mazorca en las dos categorías de la Línea D.

CARACTERÍSTICAS	DI	DII	DIFERENCIA	Prueba de T P<0.05
Planta: Altura de la mazorca.	98.067	86.333	11.733	0.0000000459
Planta: Relación entre la altura la mazorca superior y altura de la planta	0.422	0.394	0.028	
Hoja: Ancho de lámina.	9.223	9.047	0.177	
Planta: Número de mazorcas por planta.	1.500	1.367	0.133	
Mazorca: Longitud del pedúnculo.	6.604	6.12	0.484	
Mazorca: Longitud.	14.564	14.436	0.128	
Mazorca: Diámetro.	45.14	44.58	0.56	
Mazorca: Forma.	1.98	1.94	0.04	
Mazorca: Arreglo de hileras de granos.	3.04	2.54	0.5	
Mazorca: Número de hileras de granos.	17.8	17.32	0.48	
Mazorca: Número de granos por hilera.	26.2	25.76	0.44	
Mazorca: Forma de la corona del grano.	1	1	0	
Mazorca: Color del grano. (Apariencia externa sin desgranar)	2	2	0	

El análisis de componentes principales permitió inferir la similitud genética entre las versiones de cada línea. En la Figura 10 (Biplot) se puede observar la posición de cada línea y categoría con respecto a cada componente calculado. En el Cuadro 10, se reportan los valores propios de la matriz de correlación en la que fueron calculados los componentes. Los valores acumulados indican que los dos primeros componentes explicaron el 64.70% de la variación encontrada en los datos.

Cuadro 19. Valores propios de la matriz de correlación para componentes principales de datos morfológicos de cuatro líneas parentales de maíz, con dos categorías.

COMPONENTE	VALOR DEL COMPONENTE	PORCENTAJE	ACUMULADO
1	17.1407	37.2624	37.2624
2	12.6218	27.4389	64.7013
3	8.5355	18.5555	83.2568
4	3.8563	8.3834	91.6402
5	2.6184	5.6922	97.3324
6	0.6587	1.4322	98.7646
7	0.5682	1.2354	100
8	0	0	100
9	0	0	100
.	0	0	100
.	0	0	100
.	0	0	100
46	0	0	100

De acuerdo a los resultados obtenidos, los primeros dos componentes explican el 64% de la variación observada. El componente principal 1 (CP1) explica el 37.2624% de la variación total. Las variables que separan principalmente a cada línea, en el CP1, con respecto a variables medidas en hoja son las siguientes: longitud y ancho; en tallo: longitud de entrenudo, diámetro y coloración; en espiga: longitud de pedúnculo, longitud de rama principal, densidad de espiguillas y coloración; de jilote: intensidad de coloración; de mazorca: forma y número de hileras de granos.

El componente principal 2 (CP2) presenta un valor propio de 12.6218 y explica el 27.4389% de la variación total. Estos dos componentes principales explican el 64.7013% de la variación total. En el CP2, se agrupan de nuevo variables de hoja, como son: ángulo de inserción de las hojas debajo de la mazorca superior, forma de la punta, pubescencia sobre el margen de la vaina, coloración de la vaina, ángulo de la espiga, número de ramas laterales primarias de la espiga, coloración por antocianinas en los estigmas del jilote, longitud de la planta; variables de mazorca: altura, relación de la altura de la mazorca superior y la altura de la planta, mazorcas por planta, longitud del pedúnculo de la mazorca, longitud y diámetro de la mazorca, arreglo de las hileras de granos, número de granos por hilera y forma de la corona del grano.

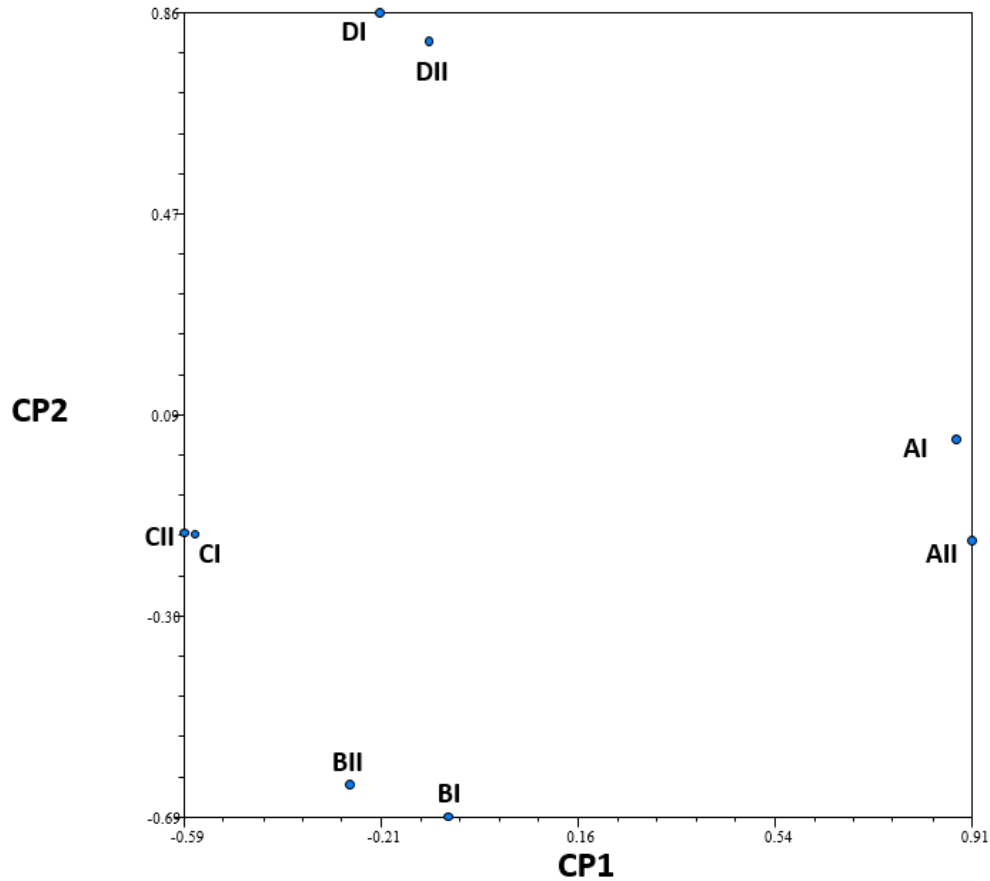


Figura 10. Gráfica Biplot que muestra la ubicación de las líneas de maíz con sus categorías con respecto a las variables morfológicas evaluadas.

Para la línea parental A, las diferencias entre las dos categorías evaluadas en este trabajo se presentan principalmente en el componente principal 2, en el cual se agrupan caracteres en su mayoría cualitativos como lo son: ángulo de inserción de las hojas debajo de la mazorca superior, forma de la punta, coloración de la vaina, ángulo de la espiga, coloración por antocianinas en los estigmas del jilote, entre otras. Lo cual sugiere una posible pérdida de la pureza genética para esta línea parental en la categoría registrada ya que como señala Rathinavel. (2017) a diferencia de las características cuantitativas, las características cualitativas son utilizadas ampliamente para la caracterización morfológica del germoplasma, debido a que son relativamente menos influenciadas por el ambiente.

El análisis de componentes principales permitió contrastar las diferencias con respecto a las características fenotípicas (morfología) de las líneas parentales evaluadas, se puede observar que las líneas difieren entre sí. Sin embargo, entre la categoría original y la categoría registrada de cada una de las líneas, no existe diferencia marcada, excepto en la línea A que muestra una ligera diferencia entre las variables agrupadas en el CP2 tal como se observa en la Figura 10.

La diferencia que se encuentra entre la categoría original y la registrada en las líneas B y D, con respecto al CP1, puede deberse a que son variables influenciadas por el medio ambiente, ya que, como mencionan Nicotra, *et al.*, (2010), las hojas indican capacidad fotosintética, contenido de nitrógeno y su crecimiento relativo puede estar regulado por la fertilidad del suelo particular donde se encuentran las plantas.

La línea parental C muestra el mayor nivel de similitud entre las categorías de semilla evaluadas, tanto en el componente principal 1 en el que principalmente se agrupan características cualitativas, así como en el componente principal 2 donde se agrupan características en su mayoría cuantitativas, por lo cual se puede asumir que morfológicamente la línea parental C es la que conserva el porcentaje más alto de pureza genética entre las cuatro líneas parentales evaluadas

En los Cuadros 20, Cuadro 21 y Cuadro 22 se encuentran los valores de los vectores característicos que fueron utilizados para la elaboración de la gráfica biplot de la Figura 10.

Cuadro 20. Vectores característicos para componentes principales de datos morfológicos de cuatro líneas parentales de maíz, con dos categorías.

CARACTERÍSTICA	CP1	CP2	CP3	CP4
Primera hoja: Coloración de la vaina por antocianinas	0.4973	0.1482	0.8374	0.1606
Primera hoja: Longitud (cm)	-0.9884	0.0140	-0.0417	-0.0828
Primera hoja : Ancho (cm)	-0.9524	0.1837	0.2192	0.0687
Primera hoja : Relación Largo/Ancho	0.8943	-0.1612	-0.3708	-0.1180
Primera hoja : Forma de la Punta	-0.5588	-0.7241	0.1398	0.1593
Hoja: Ángulo de inserción de las hojas abajo de la mazorca superior	-0.4985	-0.6192	0.5576	0.2225
Hoja: Forma característica	-0.4959	0.5187	-0.4843	-0.2275
Hoja: Ondulación del margen laminar.	0.3706	0.0987	0.6626	0.0896
Tallo: Coloración por antocianinas en raíces adventicias.	-0.9474	0.2299	0.2077	0.0403
Tallo: Longitud media de entrenudos inferiores.	0.6159	0.5946	-0.2309	0.0010
Tallo: Diámetro. Medio en la parte media del entrenudo de la mazorca superior (mm)	0.6268	0.1337	0.2098	0.3068
Tallo: Longitud media de entrenudos superiores.	0.5579	0.2242	0.5935	-0.3907
Tallo: Grado de zigzaguo.	-0.5534	-0.6024	-0.5386	0.0433
Tallo: Coloración por antocianinas en nudos.	-0.9294	0.2304	0.2278	-0.0991
Hoja: Coloración de la lámina.	0.4325	0.5085	0.1921	0.1864
Hoja: Coloración de la vaina en las tres primeras hojas de la base del tallo.	-0.9726	0.2079	0.0491	-0.0491
Hoja: Coloración por antocianinas en la vaina, en la parte media de la planta.	-0.9315	0.2533	0.1992	0.1638
Hoja: Coloración de la vaina en la hoja de la mazorca principal.	-0.5881	-0.7004	-0.3817	0.0964
Hoja: Coloración de la aurícula.	-0.3237	-0.1873	0.8758	0.0306
Hoja: Pubescencia sobre el margen de la vaina.	-0.1931	0.6014	0.2326	0.7301

Cuadro 21. Vectores característicos para componentes principales de datos morfológicos de cuatro líneas parentales de maíz, con dos categorías.

CARACTERÍSTICA	CP1	CP2	CP3	CP4
Espiga: Longitud del pedúnculo (cm)	-0.6526	0.6142	0.3893	-0.1947
Espiga: Longitud.	-0.4503	-0.3915	-0.7015	0.3535
Espiga: Longitud del eje principal.	-0.5865	0.1140	-0.7802	0.1289
Espiga: Ángulo.	0.4940	0.6336	0.5770	-0.0964
Espiga: Posición de ramas laterales.	0.0121	0.4236	0.3849	-0.5939
Espiga: Número de ramas laterales primarias.	-0.4832	-0.7706	0.3107	0.2119
Espiga: Ramas Secundarias.	-0.1730	-0.0465	-0.9292	0.0943
Espiga: Densidad de espiguillas.	0.6441	0.1436	-0.1861	0.6518
Espiga: Coloración por antocianinas en las glumas.	-0.9495	0.2254	0.2025	0.0605
Espiga: Coloración por antocianinas en las anteras.	-0.9429	0.2416	0.2116	0.0548
Jilote: Coloración por antocianinas en los estigmas.	-0.3086	0.7991	0.5134	-0.0169
Jilote: Intensidad de la coloración por antocianinas.	-0.9221	0.2894	0.2510	0.0284
Espiga: Longitud de ramas laterales. (cm)	-0.5205	-0.2949	-0.1153	-0.7324

Cuadro 22. Vectores característicos para componentes principales de datos morfológicos de cuatro líneas parentales de maíz, con dos categorías.

CARACTERÍSTICA	CP1	CP2	CP3	CP4
Planta: longitud.	0.3915	0.7752	-0.0757	-0.0119
Planta: Altura de la mazorca.	0.0997	0.8410	-0.4375	0.0352
Planta: Relación entre la altura la mazorca superior y altura de la planta	-0.0781	0.7892	-0.5757	0.0527
Hoja: Ancho de lámina.	0.6664	-0.6097	0.4101	0.1155
Planta: Número de mazorcas por planta.	0.5609	-0.6650	0.4159	0.1149
Mazorca: Longitud del pedúnculo.	-0.3120	-0.7627	0.4229	0.3198
Mazorca: Longitud.	-0.1127	0.9145	0.0405	0.3528
Mazorca: Diámetro.	-0.4560	0.6556	-0.0924	0.5551
Mazorca: Forma.	-0.8495	-0.4056	-0.1528	0.1270
Mazorca: Arreglo de hileras de granos.	0.4187	0.7737	-0.4476	-0.0143
Mazorca: Número de hileras de granos.	-0.6041	0.2150	0.2459	-0.6633
Mazorca: Número de granos por hilera.	-0.3764	0.5950	0.5034	0.4446
Mazorca: Color del grano. (Apariencia externa sin desgranar)	0.2726	-0.8910	0.1123	0.1378

4.2 Caracterización molecular por ISSR

LINEA A

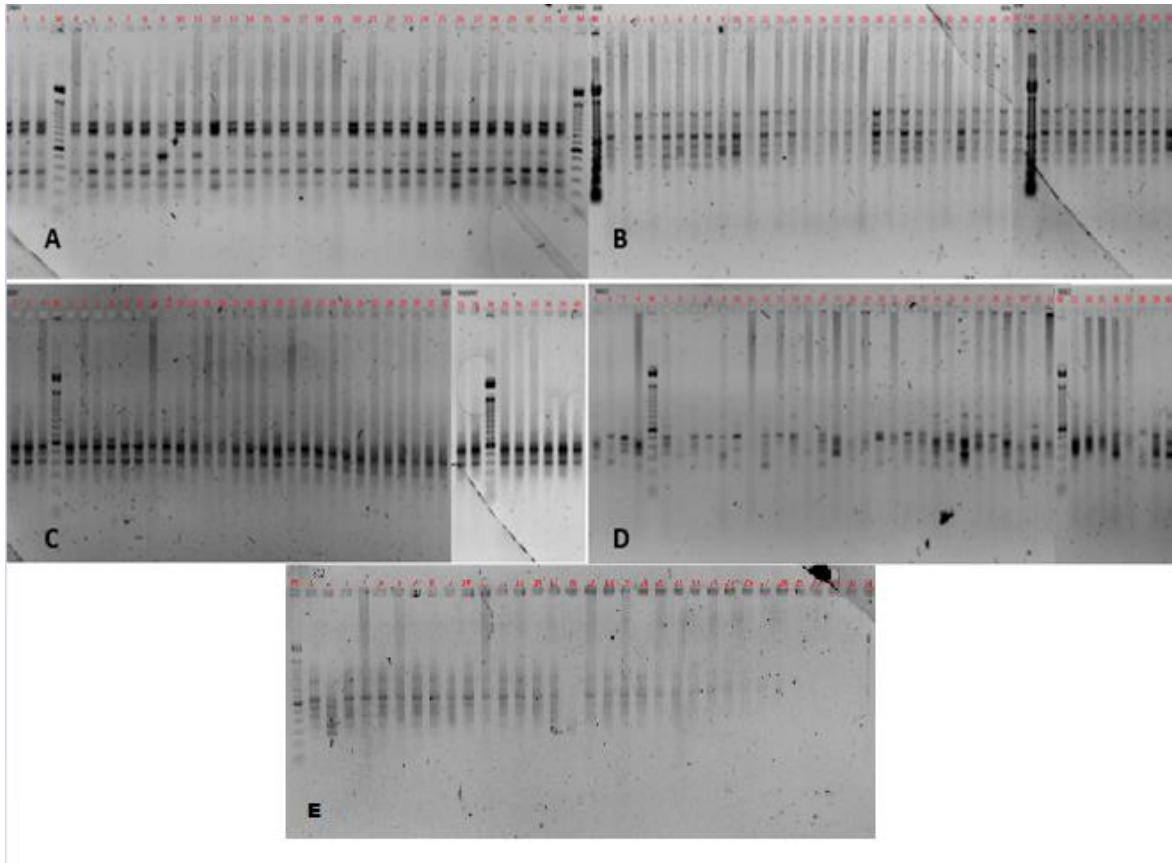


Figura 11. Patrones de amplificación específicos en geles de agarosa de alta resolución para la línea A con dos categorías de semilla, con los cinco iniciadores ISSR utilizados: A: John, B: Mao, C: Manny, D: 812 y E: 898

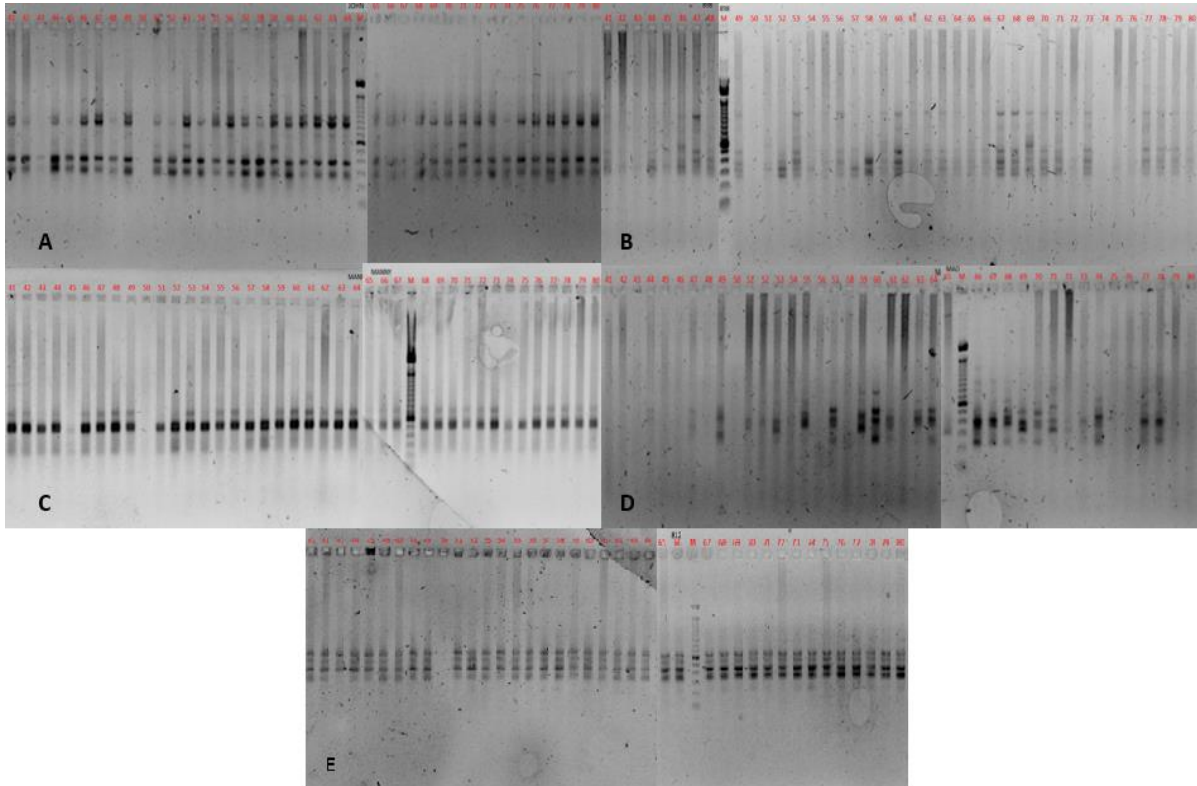
LINEA B

Figura 12. Patrones de amplificación específicos en gels de agarosa de alta resolución para la línea B con dos categorías de semilla, con los cinco iniciadores ISSR utilizados: A: John, B: Mao, C: Manny, D: 812 y E: 898

LINEA C

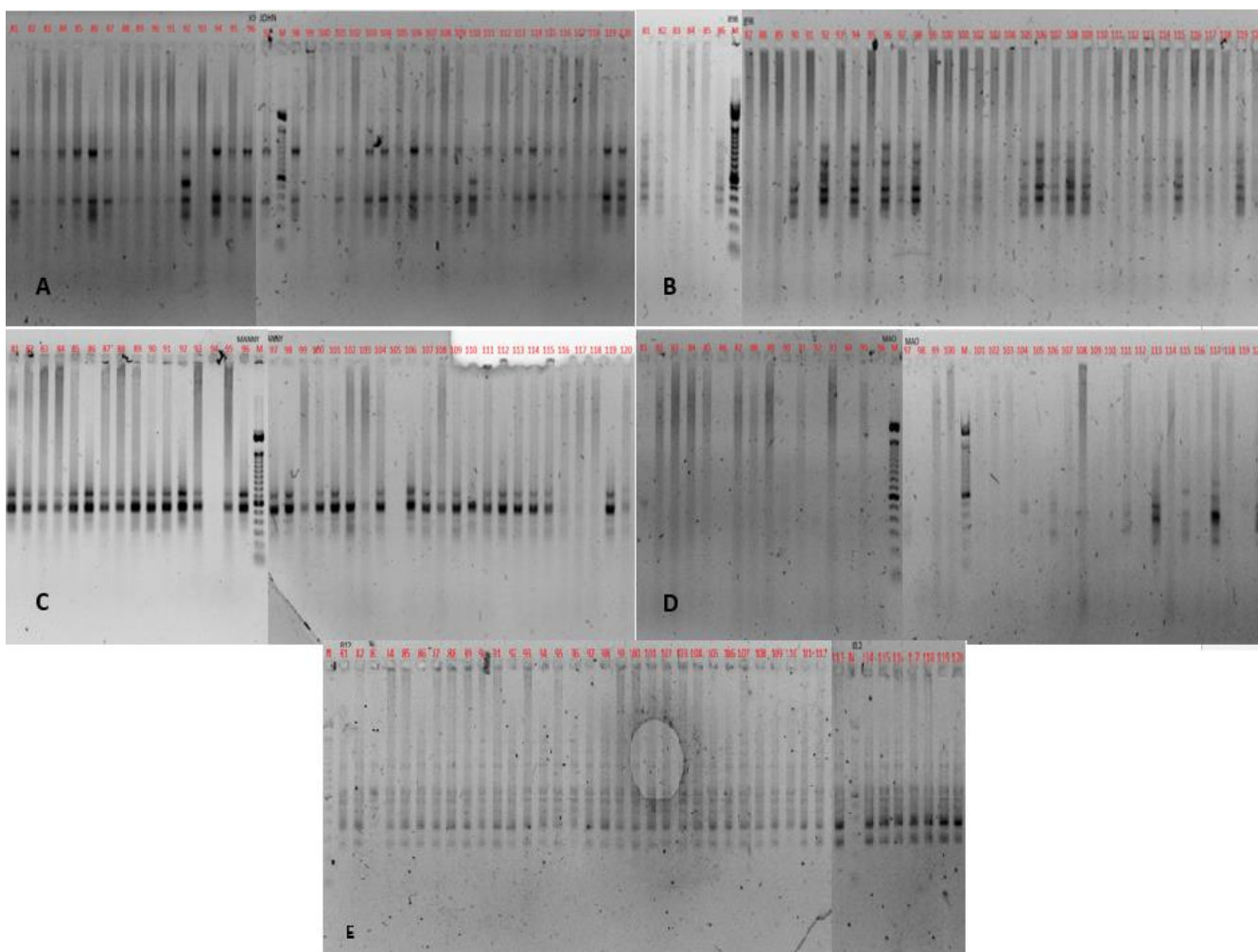


Figura 13. Patrones de amplificación específicos en geles de agarosa de alta resolución para la línea C con dos categorías de semilla, con los cinco iniciadores ISSR utilizados: A: John, B: Mao, C: Manny, D: 812 y E: 898

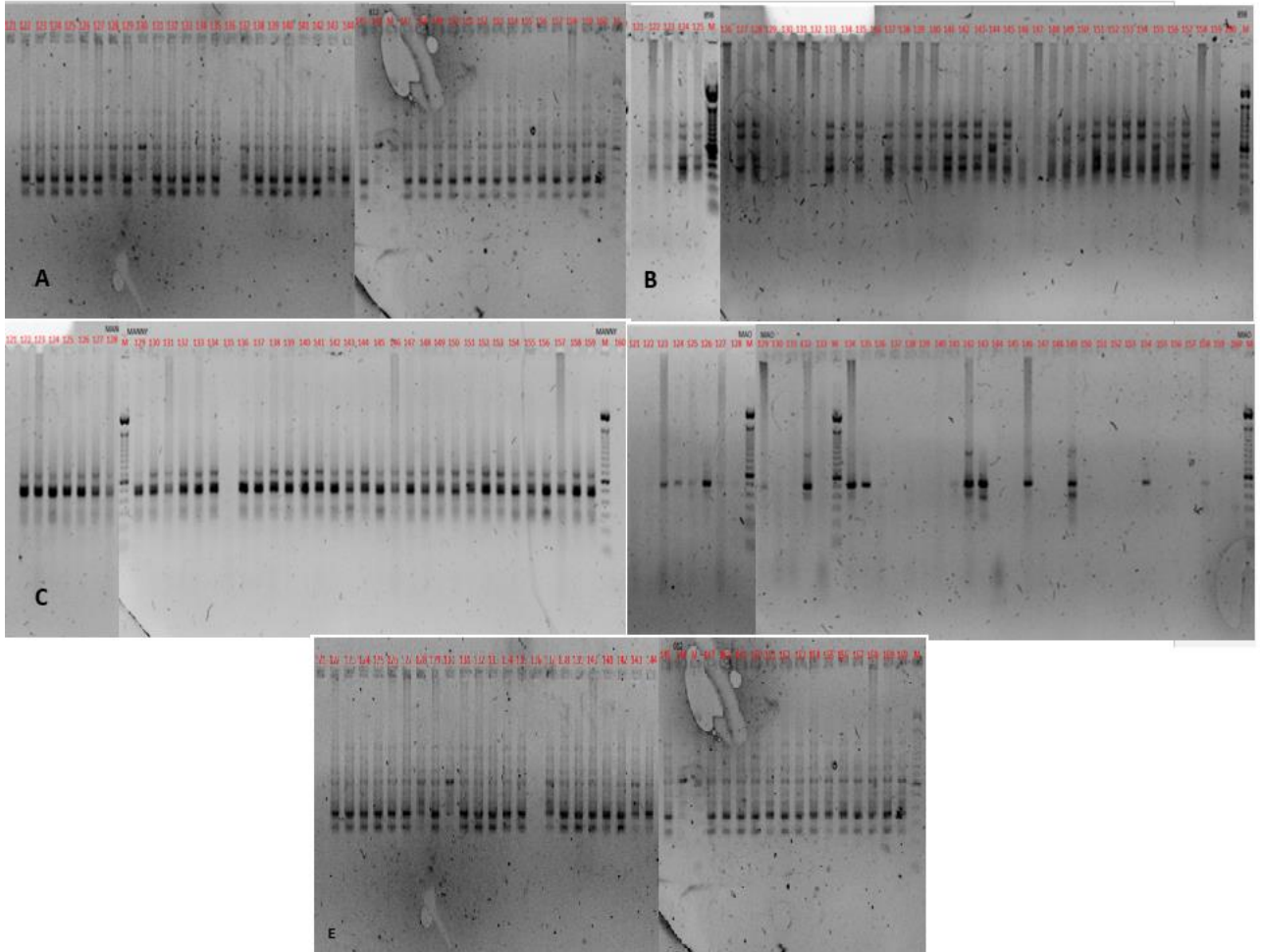
LINEA D

Figura 14. Patrones de amplificación específicos en geles de agarosa de alta resolución para la línea D con dos categorías de semilla, con los cinco iniciadores ISSR utilizados: A: John, B: Mao, C: Manny, D: 812 y E: 898

Los valores de similitud obtenidos entre las categorías de semilla a partir del coeficiente de Jaccard, para las cuatro líneas parentales fueron los siguientes: Para la línea A se obtuvieron valores del 0.65 a 1, para la línea B de 0.61 a 1, para la línea C de 0.59 a 1 y para la línea D se obtuvieron valores de 0.74 a 1.

El porcentaje de polimorfismo que se encontró con el marcador ISSR en las líneas de maíz fue: Línea A 50%, Línea B 78%, Línea C 80% y la D 47%. En las cuatro líneas se encontró un mayor porcentaje de polimorfismo que el reportado por El-Hosary y El-AkKad (2015), quienes utilizaron este mismo marcador en maíz y reportaron el 36.46% de polimorfismo. Esto indica que el marcador molecular ISSR es adecuado para detectar similitud genética entre líneas parentales de maíz.

Los resultados demostraron que los marcadores ISSR pueden ser usados eficientemente para detectar similitud genética entre categorías de semilla de líneas parentales de maíz

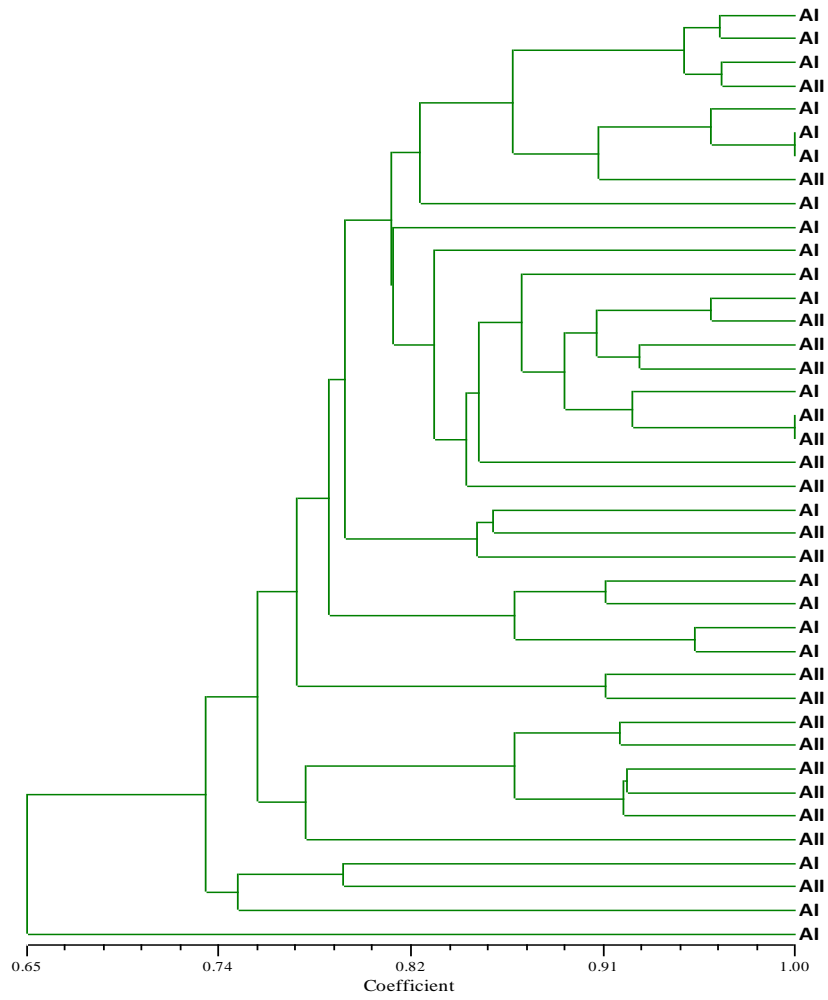


Figura 15. Dendrograma de similitud con el coeficiente de Jaccard para la línea A con dos categorías.

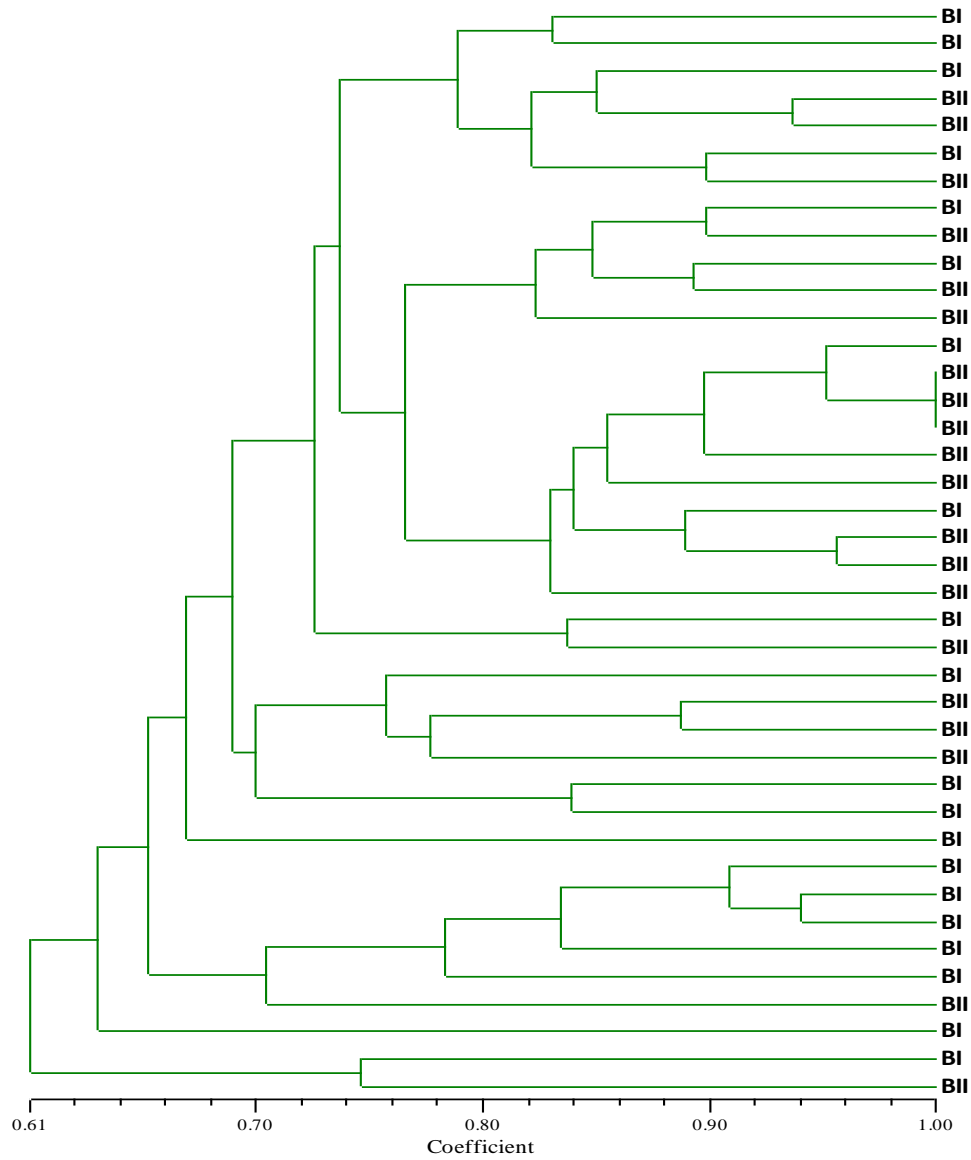


Figura 16. Dendrograma de similitud con el coeficiente de Jaccard para la línea B con dos categorías.

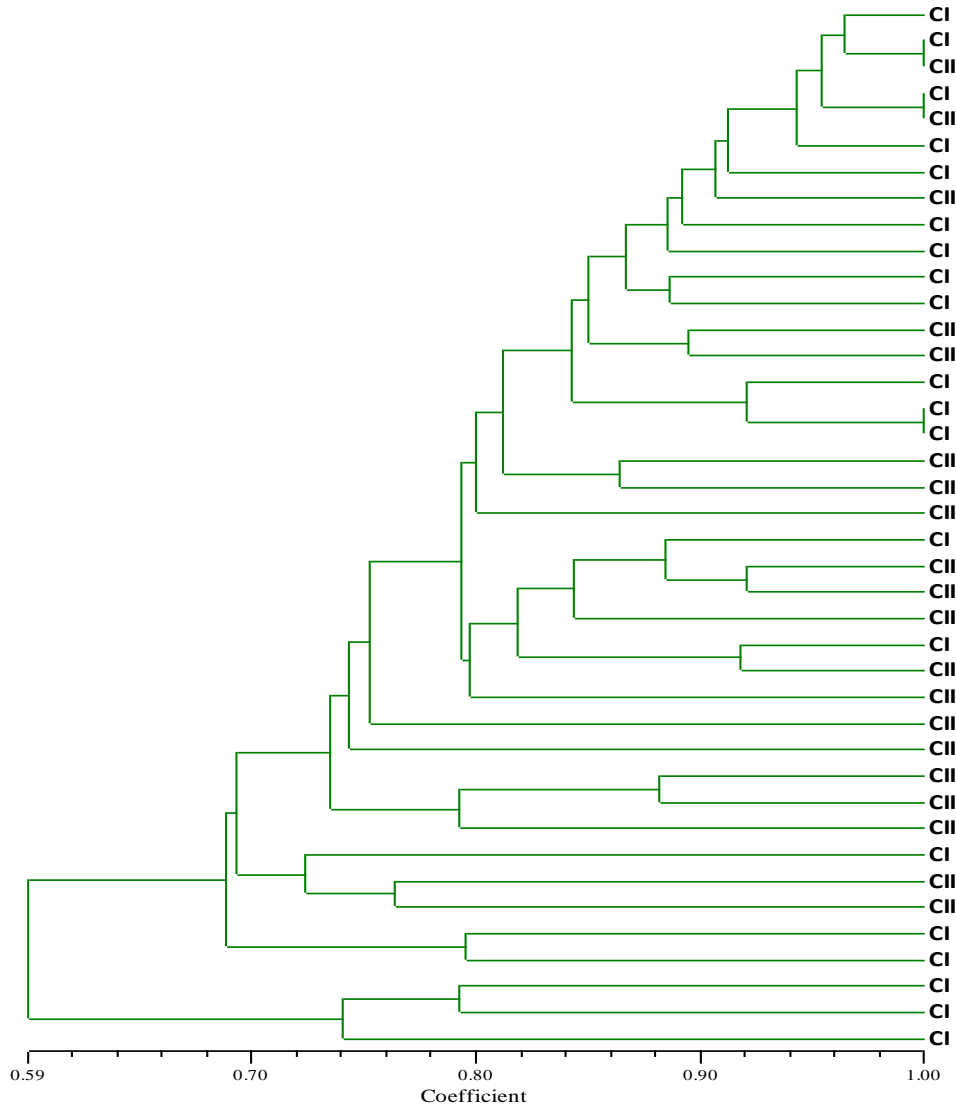


Figura 17. Dendrograma de similitud con el coeficiente de Jaccard para la línea C con dos categorías.

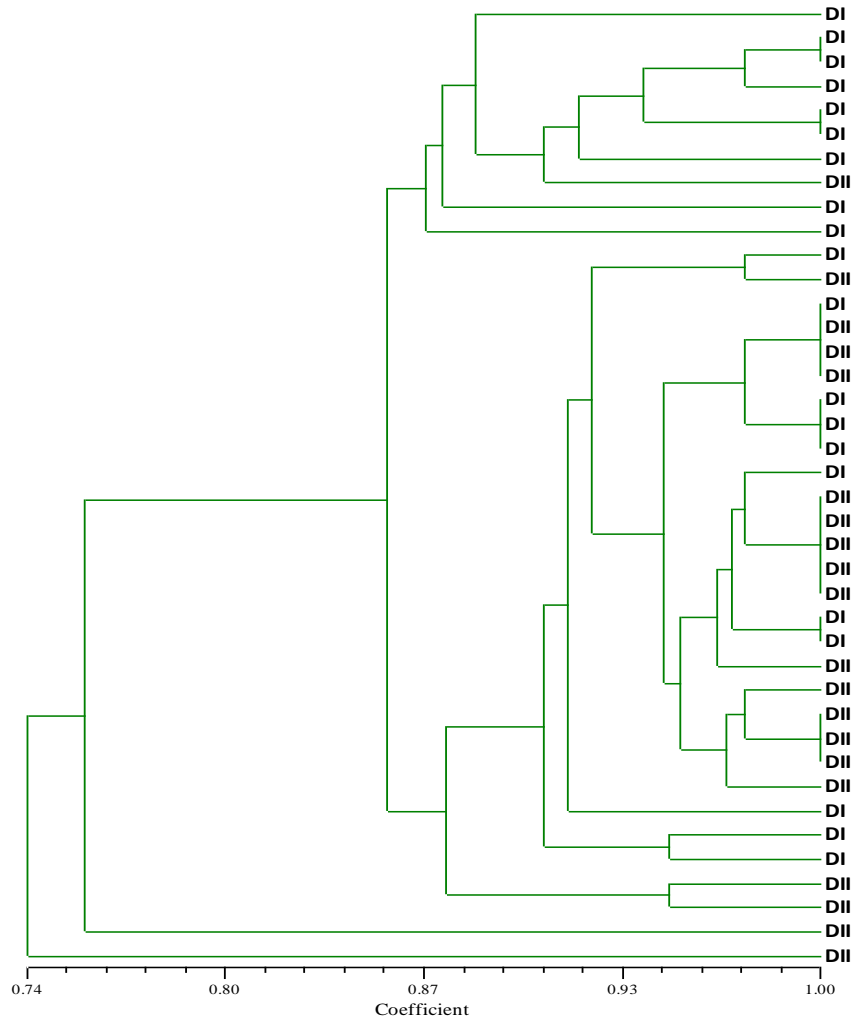


Figura 18. Dendrograma de similitud con el coeficiente de Jaccard para la línea D con dos categorías.

En el caso del análisis de similitud y de agrupamiento de las líneas analizadas, se pone de manifiesto nuevamente las características individuales en cada línea y cada categoría. Lo esperado en cada análisis es que los individuos tengan una similitud que asocie las dos categorías, lo que presupone que siguen teniendo tanto genotipos como fenotipos compartidos. En cada línea se obtuvieron algunas plantas fuera de tipo, entendiendo esto como un valor atípico o generalmente como una observación que se considera inconsistente con la distribución de valores en el conjunto de datos que se analiza. La proporción de plantas de este tipo en cada línea, no supera el 5% con respecto al número de plantas consideradas en cada análisis.

4.3 Caracterización por SSR

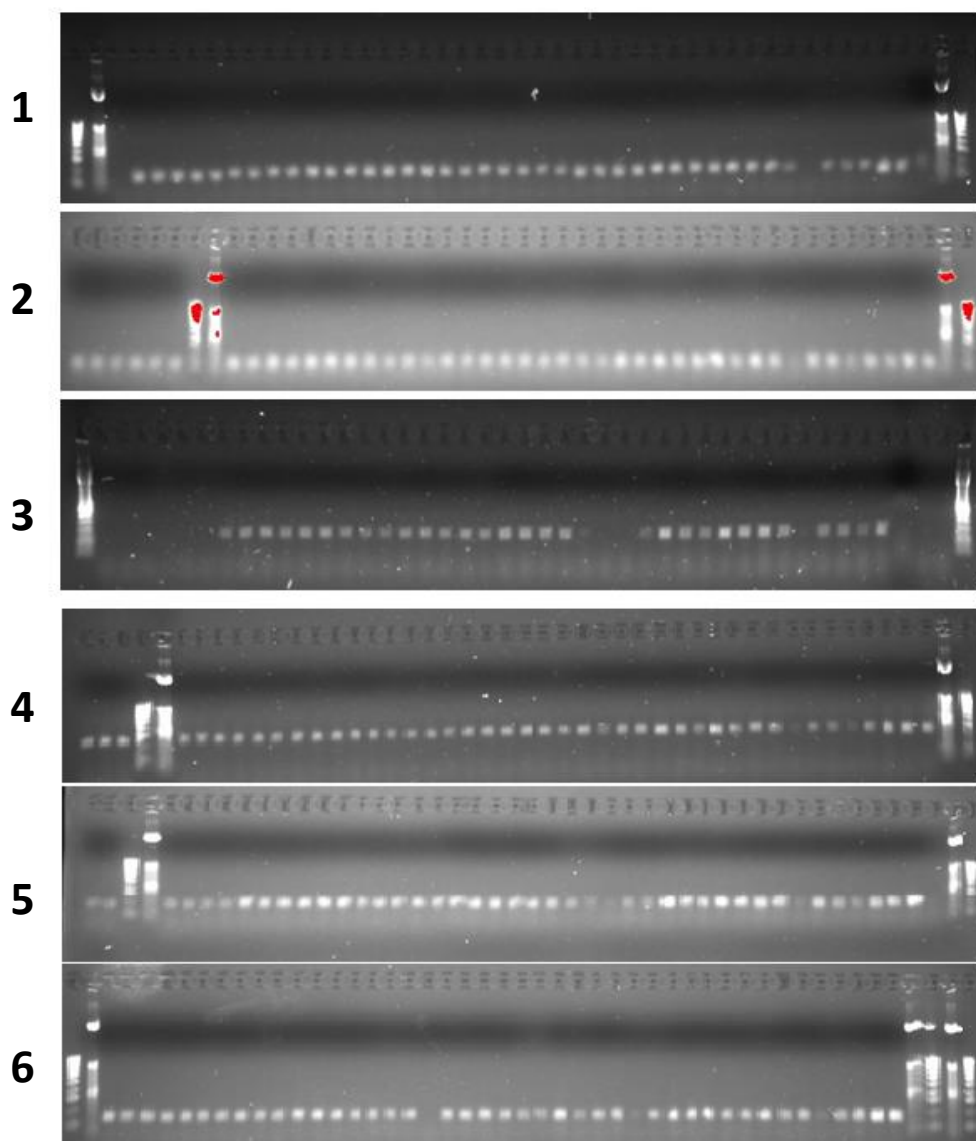


Figura 19. Patrones de amplificación específicos representativos de geles de agarosa de alta resolución para la línea parental B con dos categorías con 6 de los 10 iniciadores SSR utilizados: 1: phi120, 2: phi96100, 3: phi099, 4: phi076, 5: phi0109188 y 6: phi15987

Los diez iniciadores SSR seleccionados en el presente estudio están distribuidos en los diez cromosomas del maíz asegurando así la cobertura del genoma entero. Estos diez iniciadores generaron un patrón de bandas claro y solo uno proporciono un patrón polimórfico en la línea parental A.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran la diferencia entre las categorías original y registrada correspondientes a la línea parental A con el iniciador phi120, observada por la posición de la banda obtenida con este iniciador la cual fue distinta entre las categorías original y registrada

Con los iniciadores phi9600, phi076, phi0109188, phi121, PHI15987 Y PHI034, no se detectaron diferencias en la posición de las bandas obtenidas entre las categorías original y registrada en ninguna de las líneas parentales, lo que indica que estas bandas tienen el mismo tamaño, por lo cual no son polimórficas, indicando un elevado nivel de pureza genética observado con este marcador

El iniciador phi099 no generó ningún producto de amplificación de PCR para la línea parental B y el iniciador phi032 no generó producto de amplificación de PCR para la línea parental A. como se mencionó anteriormente las líneas parentales utilizadas en este estudio no están relacionadas entre sí.

Los resultados obtenidos con el marcador SSR comprueban lo mencionado por Chen *et al.*, (2005), sobre estos marcadores moleculares, que son adecuados para el análisis de pureza genética en maíz, debido a su codominancia y más la presencia de polimorfismo entre líneas parentales.

V. CONCLUSIONES

1. La comparación de una muestra obtenida de un lote de semillas con su fuente original es una manera eficiente para determinar su identidad y pureza genética
2. El análisis de componentes principales permitió demostrar que morfológicamente la línea parental C es la que conserva el mayor nivel de similitud entre las categorías de semilla evaluadas, tanto en el componente principal 1 en el que principalmente se agrupan características cualitativas, así como en el componente principal 2 donde se agrupan características en su mayoría cuantitativas.
3. En el caso de la Línea parental A, se presentan diferencias entre la semilla de categoría original y categoría registrada, principalmente en caracteres cualitativos, explicado con el análisis de componentes principales, con lo cual se puede concluir que esta línea ha disminuido su nivel de pureza genética a través de los ciclos de producción en los cuales se ha reproducido esta semilla.
4. El uso de los marcadores morfológicos tradicionales combinado con los marcadores moleculares SSR e ISSR permitió inferir que la evaluación realizada proporcione evidencia del grado de pureza genética de las líneas parentales de maíz sometidas a estudio.
5. Los microsatélites (SSR) confirmaron la similitud genética que existe entre los individuos pertenecientes a las líneas parentales B, C y D.

6. Se puede observar un patrón para la línea parental A observado con los distintos marcadores utilizados, en el cual se presentan individuos fuera de tipo, esta línea parental deberá ser incrementada a partir de la de categoría original en campos de producción con estándares más estrictos de aislamiento, para evitar la contaminación con polen externo o no deseado, para poder ser utilizada para la producción de híbridos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Alberto, J., y Gabriel, J. (2016). Variabilidad Genética de Líneas Endogámicas de Maíz Comparadas con Progenitores Criollos mediante Microsatélites *Conciencia Tecnológica*, núm. 51, enero-junio, 2016, pp. 47-52 Instituto Tecnológico de Aguascalientes
- Arista, J., y González, A. (2012). El potencial de mercado de semillas mejoradas de maíz en México. Programa de Socio economía. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo
- Bellon, M. R., y Berthaud, J. (2006). Traditional Mexican agricultural systems and the potential impacts of transgenic varieties on maize diversity. *Agriculture and Human Values*, 23(1), 3–14. <https://doi.org/10.1007/s10460-004-5861-z>
- Barril y Nates (2012). Introduction to Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis Matrices with Respect to Their Detection Sensitivities. 10.5772/38573.
- Bradford K., (2006). Methods to Maintain Genetic Purity of Seed Stocks. DOI: 10.3733/ucanr.8189
- Castillo, A. 2015. Uso de marcadores moleculares ISSR para inferir las relaciones genéticas y la variabilidad intraespecífico en Agave, (January 2007).
- Collard, B. C., Jahufer, Z., Chi, E., Pang, K. (2005). An introduction to markers , quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement : The basic concepts An introduction to markers , quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement : The basic concepts, (January 2015). <https://doi.org/10.1007/s10681-005-1681-5>
- Chávez Bravo, J. M.-P. J. D. (2015). Manual de laboratorio central de referencia (SNICS). SNICS.

- Chen, H., Hogue, P., Miller, K., Galbreth, A., Vierling, R. (2005). Using SSR as an Alternative to Isozyme for Corn Hybrid Purity Testing. *Seed Technology*, 27(1), 157-160. Retrieved from www.jstor.org/stable/23433230
- Eguiarte L.E., Gonzalez A., Sheinvar E., (2007). Genética de poblaciones en viveros de *Acupreata* e impactos de los planes de manejo en la diversidad y estructuración de esta especie. Departamento de Ecología Evolutiva. Instituto de Ecología C. U. UNAM 0410, Méx. D.F.
- Endicott, Sandy, B. B., Keith, R., Schon, R., Bremer, C., Farnham, D., DeBruin, J. Carter, P. (2015.). Maíz Crecimiento y desarrollo, 1–20.
- El-Hosary y El-Akad. (2015). Genetic diversity of maize inbred lines using ISSR markers and its implication on quantitative traits inheritance. *Arabian Journal of Biotechnology*. 18(2): 81-96.
- Gowda, M., Worku, M., Nair, S. K., Palacios-rojas, N., Huestis, G., y M, B. 2015. Aseguramiento de la Calidad / Control de la Calidad (AC / CC) en el Mejoramiento de Maíz y la Producción de Semillas : Teoría y práctica, 1–39.
- Gowda, R. (2011). Identificación of SSR Markers for Hybridity and Seed Genetic Purity Testing in Sunflower (*Helianthus annuus* L.), (54), 59–66. <https://doi.org/10.2298/HEL1154059P>
- Hayward, A. C., Tollenaere, R., Dalton-morgan, J., y Batley, J. (2015). Molecular Marker Applications in Plants, 1245(chapter 2). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1966-6>
- Hossain, F., Muthusamy, V., Bhat, J., y Jha, S. (2016). Maize Chapter · September 2016. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-3613-9>.
- IIEG. (2018). SAYULA DIAGNÓSTICO DEL MUNICIPIO Mayo 2018, 1–34.
- Intagri 2016. Instituto para la innovación tecnológica en la agricultura. Cursos agrícolas-artículos de agronomía.

- J. Alberto García-Salazar, R. R.-J. (2014). Un análisis del saldo comercial por entidad federativa the corn (*Zea mays* L.) Improved seed market in México. An analysis of the commercial balance by state, 37(1), 69–77.
- Jiang, G. (2010). Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants.
- Jonah, P. M., Bello, L. L., Lucky, O., Midau, A., Moruppa, S. M., Moruppa, S. M. (2011). Review : The importance of molecular markers in plant breeding programmes. Global Journal of Science Frontier Research, 11(5), 5–12. Retrieved from https://globaljournals.org/GJSFR_Volume11/2-Review-The-Importance-of-Molecular.pdf
- Jong G. (2005). Biología evolutiva de la población. Universidad Utrecht, Padualaan 8, NL-3584 CH utrecht.
- Kalia, R. K., Rai, M. K., y Kalia, S. (2011). Microsatellite markers : an overview of the recent progress in plants, 309–334. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0286-9>
- Kumar, J., Pratap, A., y Solanki, R. (2009). Basics of Molecular Genetic Mapping and QTL Analysis in Plants Basics of Molecular Genetic Mapping and QTL Analysis in Plants <https://doi.org/10.2174/978160805090110901010035>
- K.K. Tripathi, O.P. Govila, Ranjini Warriar, V. A. (2011). *Biology of Maize*. Department of biotechnology Ministry of science and technology y Minsitry of enviroment and sciences.
- Kordrostami, M., y Rahimi, M. (2015). Molecular markers in plants : Concepts and applications, (November).
- Lo, D., y Chan, K. C. A. (2006). *Clinical Applications of PCR*. <https://doi.org/10.1385/1-59745-074-X>
- Macrobert, J. F., Setimela, P. (2015). Manual de producción de semilla de maíz híbrido.

- Mena Munguía, Salvador, Lepiz Ildelfonso Rogelio (2017). *Genética y genotecnia 100 preguntas y respuestas*. Fundacion Colpos.
- Mburu, D., y Hanotte, O. (2005). A practical approach to microsatellite genotyping with special reference to livestock population genetics, (December).
- Nadeem M.A., Nawaz M.A., Shaid M., Dogan Y., Comerpay G., Yildiz M. (2017), DNA Molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Journal biotechnology and biotechnological equipment*. Vol 32, 2018 issue 2.
- Nafziger, E. D. (2016). *Maize Agronomy*. Encyclopedia of Food Grains (2nd ed.). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00241-9>
- Nicotra, A. B., Atkin, O. K., Bonser, S. P., Davidson, A. M., Finnegan, E. J., Mathesius, U., Y van Kleunen, M. (2010). Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in plant science*, 15(12), 684-692.
- Ng, W. L., and Tan, S. G. (2015). Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Are we doing it right? *ASM Science Journal*, 9(1), 30–39.
- Nikolic, Z., Crops, V. (2014). Genetic purity of sunflower hybrids determined on the basis of isozymes and seed storage proteins GENETIC PURITY OF SUNFLOWER HYBRIDS DETERMINED ON THE BASIS OF ISOZYMES AND SEED STORAGE PROTEINS, (June). <https://doi.org/10.2298/HEL0848047N>
- Núñez Francisco, S. J. (2016). Estudio del mercado de producción, procesamiento, distribución y comercialización de la cadena de maíz-harina / nixtamal-tortilla.
- OCDE. (2003). Consensus Document on the Biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize).
- Pradeep Reddy, M., Sarla, N., y Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128(1), 9–17. <https://doi.org/10.1023/A:1020691618797>

- Picca, a., Helguera, M., Salomón, N., y Carrera, a. (2007). Marcadores Moleculares. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*, 61–68. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132006000100012>
- Pokhriyal, B., Thorat, K., Limaye, D. A., Joshi, Y. M., Kadam, V. J., y Dubey, R. (2012). Microsatellite markers – a novel tool in molecular genetics, 2(2), 397–412.
- Rahman, T., Muhammed Salah Uddin, Razia Sultana, Arumina Moue, M. S. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. <https://doi.org/10.1385/1-59745-074-X:1>
- Reedy M.P., Sarla N., Siddiq E.A.,. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphitica*, november 2002, volumen 128, issue 1, p.p. 9-17
- Rojas, J. G. O. (2015). Manual Técnico del Cultivo de Maíz Bajo Buenas Prácticas Agrícolas.
- Rodríguez, A. K. (2016). Asociación de marcadores morfológicos y moleculares ISTR y SSR con heterosis en generaciones F1 y F2 de maíz (*Zea mays* L.), 1–63.
- Salgado, K., Vieira, D. ., Von Pinho, É., Guimarães, C. T., Von Pinho, R., y Souza, L. (2006). Genetic purity certificate in seeds of hybrid maize using molecular markers. *Revista Brasileira de Sementes*, 28, 169–175. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222006000100024>
- SAGARPA. (2017). Maíz blanco y amarillo mexicano. Planeación agrícola nacional 2017-2030 Maíz blanco y amarillo (Vol. I).
- Saghai – Maroof, K.M Soliman, R.A. Jorgensen, and R.W. Allard. (1984). .Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci . USA*, vol. 81, pp 8014-8018, december 1984, population biology.

- Shiferaw, B., Prasanna, B. M., Hellin, J., y Bänziger, M. (2011). Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security, (2011), 307–327. <https://doi.org/10.1007/s12571-011-0140-5>
- Smith y Register (1998). Genetic purity and testing technologies for seed quality: A company perspective. *Seed Science Research*. 8. 285 - 294. 10.1017/S0960258500004189.
- SNICS (2014). Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. Organismo desconcentrado de la secretaría de agricultura, encargado de verificar la calidad de las semillas, proteger los derechos de quien obtiene una nueva variedad vegetal.
- Sukhumsirichart, W. (2018). Polymorphisms. Genetic Diversity and Disease Susceptibility. doi:10.5772/intechopen.76728
- Tharwat, A. (2017). Principal component analysis - a tutorial Principal Component Analysis - A Tutorial. <https://doi.org/10.1504/IJAPR.2016.079733>
- Tiessen-Favier, A. (2012). Fundamentos de mejoramiento genético vegetal. EAE.,
- UNAM (2007). Universidad Nacional Autónoma de México, memorias, UNAM 40. Dirección General de Planeación. www.planeación.unam.mx.
- Vigoroux, Y., J. C. Glaubitz, Y. Matsuoka, M.M. Goodman, J. Sánchez G., and J. Doebley. (2008). Population structure and genetic diversity of New World maize landraces assessed by DNA microsatellites. *American Journal of Botany* 95: 1240-1253. Doi: 10.3732/ajb.0800097
- Villardón, J.L. (2011), Los métodos Biplot (teoría), Departamento de Estadística, Universidad de Salamanca, Venezuela. Pág. 4-12
- Weising K., Nybom, Wolff K., Kahl G. (2005). DNA finger printing in plant principles. Department of Sciences at the University of Kaisel, Germany.
- Zaidi, P.H.; Azrai, M. and Pixley, K.V., eds. (2010). *Maize for Asia: Emerging Trends and*

Zavala, Y., Merino, A., Sánchez, M , Ávila, F. (2014). Industria semillera de maíz en Jalisco. Actores sociales en conflicto, 241–278.

K., Rathinavel. (2017). Exploration of Genetic Diversity for Qualitative Traits among the Extant Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Varieties and Parental Lines. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 6. 2407-2421. 10.20546/ijcmas.2017.608.285.

VII. ANEXOS

Cuadro 23. Comparativo de los promedios de variables morfológicas de hoja y tallo, en cuatro líneas parentales de maíz, con dos categorías.

CARACTERÍSTICAS	AI	AII	BI	BII	CI	CII	DI	DII
Primera hoja: Coloración de la vaina por antocianinas	6.400	6.267	5.000	5.533	4.571	4.125	6.933	7.000
Primera hoja: Longitud (cm)	4.967	4.933	6.267	6.067	5.186	5.156	4.437	4.850
Primera hoja : Ancho (cm)	1.657	1.580	3.767	3.767	1.600	1.453	1.520	1.480
Primera hoja : Relación Largo/Ancho	3.023	3.136	1.681	1.622	3.285	3.604	3.116	3.298
Primera hoja : Forma de la Punta	3.033	2.900	2.900	2.867	2.714	2.438	2.333	2.133
Hoja: Ángulo de inserción de las hojas abajo de la mazorca superior	2.000	2.000	1.800	1.867	1.000	1.000	1.067	1.033
Hoja: Ángulo entre la lámina y el tallo	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000
Hoja: Ángulo de inserción de las hojas por arriba de la mazorca superior.	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Hoja: Forma característica	1.000	1.000	3.000	3.067	3.000	3.000	1.333	3.000
Hoja: Ondulación del margen laminar.	2.233	2.233	2.100	2.200	2.071	2.094	2.167	2.400
Tallo: Coloración por antocianinas en raíces adventicias.	1.000	1.000	9.000	8.667	1.000	1.000	1.133	1.000
Tallo: Número de hijuelos por planta.	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Tallo: Longitud media de entrenudos inferiores.	12.307	9.581	10.671	11.094	12.477	12.738	13.925	13.196
Tallo: Diámetro. Medio en la parte media del entrenudo de la mazorca superior (mm)	14.500	12.820	12.367	12.807	13.082	12.991	15.363	12.953
Tallo: Longitud media de entrenudos superiores.	11.342	11.091	11.153	10.377	11.163	10.236	11.743	11.828
Tallo: Grado de zigzaguo.	3.400	3.333	3.400	3.400	3.500	3.438	3.000	3.000

Tallo: Coloración por antocianinas en nudos.	1.000	1.000	4.400	3.467	1.000	1.000	1.200	1.000
Hoja: Presencia de arrugas longitudinales.	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Hoja: Coloración de la lámina.	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.100	2.000
Hoja: Coloración de la vaina en las tres primeras hojas de la base del tallo.	2.000	2.000	4.633	4.233	2.357	2.438	1.967	2.000
Hoja: Coloración por antocianinas en la vaina, en la parte media de la planta.	1.000	1.000	3.167	3.600	1.000	1.000	1.100	1.000
Hoja: Coloración de la vaina en la hoja de la mazorca principal.	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	1.133	1.067
Hoja: Coloración de la aurícula.	3.000	3.000	3.000	3.000	2.000	2.000	2.367	3.000
Hoja: Pubescencia sobre el margen de la vaina.	1.000	1.000	1.000	3.000	1.000	1.000	2.400	1.400

Cuadro 24. Comparativo de los promedios de variables morfológicas de espiga y jilote, en cuatro líneas parentales de maíz, con dos categorías.

Características	AI	AII	BI	BII	CI	CII	DI	DII
Espiga: Longitud del pedúnculo (cm)	7.223	7.693	15.557	13.173	8.075	7.725	11.200	11.397
Espiga: Longitud.	29.240	29.953	28.533	32.703	31.561	33.581	25.410	25.627
Espiga: Longitud del eje principal.	21.343	21.753	25.657	28.610	27.979	29.209	20.999	21.713
Espiga: Ángulo.	1.333	1.467	1.467	1.333	1.000	1.000	2.867	2.933
Espiga: Posición de ramas laterales.	1.000	1.000	1.067	1.000	1.000	1.000	1.000	1.133
Espiga: Número de ramas laterales primarias.	4.667	4.133	3.633	3.767	2.214	2.281	1.533	1.400
Espiga: Ramas Secundarias.	1.533	1.267	1.800	2.867	3.571	6.250	1.000	1.000
Espiga: Densidad de espiguillas.	5.800	6.200	1.400	6.800	6.500	6.438	7.000	7.000
Espiga: Coloración por antocianinas en las glumas.	1.000	1.000	9.000	9.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Espiga: Coloración por antocianinas en las anteras.	1.000	1.000	9.000	8.867	1.000	1.000	1.267	1.067
Jilote: Coloración por antocianinas en los estigmas.	1.267	1.000	9.000	9.000	1.000	1.000	9.000	9.000
Jilote: Intensidad de la coloración por antocianinas.	1.067	1.000	9.000	8.933	1.000	1.000	1.267	2.200
Espiga: Longitud de ramas laterales. (cm)	18.990	19.860	36.823	11.920	20.521	22.000	12.800	13.120

