

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA Y MOLECULAR
DE MAÍCES AZULES PARA LOS VALLES ALTOS
CENTRALES DE MÉXICO**

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN
BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

PRESENTA:

OSCAR HORACIO GUILLÉN AYALA



**DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES**

Noviembre, 2008

Chapingo, Estado de México



**CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA Y MOLECULAR DE MAÍCES
AZULES PARA LOS VALLES ALTOS CENTRALES DE MÉXICO**

Tesis realizada por **Oscar Horacio Guillén Ayala** bajo la dirección del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA.

DIRECTOR:



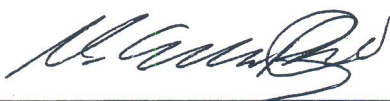
Dr. José de Jesús López Reynoso.

ASESOR:



Dra. Ernestina Valadez Moctezuma.

ASESOR:



Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mi esposa Sandra, como una muestra de agradecimiento por su amor, comprensión y apoyo incondicional que me ha brindado para la realización de mis estudios de Maestría. No hay palabras ni acciones para pagarte todo lo que has hecho por mí. Te estaré agradecido eternamente.

A mis hijas Centli y Lucero, mis dos tesoros, esperó que este trabajo las motive a seguir superandose en la vida; con todo mi amor por ustedes.

A mis Padres y hermanos, gracias por su amor y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, por haberme permitido realizar los estudios de Maestría.

Al Dr. José de Jesús López Reynoso, Dra. Ernestina Valadez Moctezuma y Dra. Margarita Gisela Peña Ortega, por su valiosa ayuda para la realización de esta tesis.

Mi agradecimiento al M. C. Abimael López López, por su gran ayuda para la realización de la parte molecular de este trabajo.

A la Dra. Margarita Gisela Peña Ortega y Dr. Oscar Mascorro Gallardo, por apoyarme para ingresar al Programa de Biotecnología Agrícola.

A la Coordinación de Postgrado del Programa de Biotecnología Agrícola.

DATOS BIOGRÁFICOS

Oscar Horacio Guillén Ayala, mexicano de nacimiento, obtuvo su título de Ingeniero Agrícola en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Laboró como Asesor Técnico en la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH).

Participó como Investigador Adjunto en el Programa de Maíz en el Campo Agrícola Experimental Cotaxtla, Veracruz, del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA).

Trabajó como Investigador Titular en el Programa de Mejoramiento Genético de Frutales Tropicales en la Comisión Nacional de Fruticultura (CONAFRUT)

Actualmente es Profesor Definitivo en la carrera de Ingeniero Agrícola de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos.....	4
1.2 Hipótesis.....	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Origen y distribución del maíz azul en los Valles Altos Centrales de México.....	5
2.2 Características químicas del maíz azul.....	8
2.3 Características agronómicas del maíz azul.....	10
2.4 Usos del maíz azul.....	12
2.5 Industrialización del maíz azul.....	16
2.6 Aspectos genéticos que interfieren en la coloración del grano de maíz azul.....	17
2.7 Interacción genotipo ambiente.....	20
2.8 Caracterización de especies vegetales.....	23
2.9 Huellas genómicas.....	24
2.10 Tipos de Marcadores.....	25
2.10.1 Marcadores morfológicos.....	25
2.10.2 Marcadores bioquímicos.....	27

	Página
2.10.3 Marcadores moleculares.....	30
2.10.3.1 Reacción en cadena de la polimeraza (PCR).....	32
2.10.3.2 Secuencias Simples Repetidas o Microsatélites (SSR).....	34
2.11 Caracterización morfológica vs caracterización molecular.....	38
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
3.1 Material genético.....	43
3.2 Caracterización agronómica.....	43
3.2.1 Localización del sitio experimental.....	43
3.2.2 Unidad experimental.....	44
3.2.3 Diseño experimental.....	44
3.2.4 Variables agronómicas evaluadas.....	44
3.2.5 Análisis estadístico.....	46
3.2.6 Manejo agronómico del experimento.....	47
3.3 Caracterización molecular.....	47
3.3.1 Obtención del material vegetal.....	48
3.3.2 Liofilización de las muestras.....	48
3.3.3 Extracción del DNA.....	48
3.3.4 Cuantificación del DNA.....	49
3.3.5 Determinación de la calidad del DNA.....	52
3.3.6 Selección de iniciadores SSR.....	53
3.3.7 Establecimiento de la reacción de PCR para la técnica de SSR.....	54
3.3.8 Condiciones de termociclaje para la técnica SSR.....	54
3.3.9 Electroforesis de los productos amplificados.....	57
3.3.10 Codificación de datos y análisis estadístico.....	59
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
Caracterización Agronómica.....	61

	Página
4.1 Análisis de varianza.....	61
4.2 Comparación de medias.....	62
4.2.1 Número de plantas por parcela (NPP).....	63
4.2.2 Días a floración masculina (DFM) y femenina (DFF).....	64
4.2.3 Altura de planta (AP) y de mazorca (AM).....	68
4.2.4 Mazorcas por planta (MPP).....	71
4.2.5 Peso de campo (PDC).....	72
4.2.6 Rendimiento por planta (RPP).....	74
4.2.7 Diámetro de mazorca (DMM) y olote (DOL).....	75
4.2.8 Longitud de mazorca (LM).....	77
4.2.9 Número de hileras por mazorca (NHM) y número de granos por hilera (NGH).....	79
4.2.10 Porcentaje de grano (PG).....	81
4.3 Análisis de Correlación Simple.....	82
4.4 Análisis Multivariados.....	88
Caracterización Molecular.....	97
V. DISCUSIÓN GENERAL	112
VI. CONCLUSIONES	117
VII. LITERATURA CITADA	119
VIII. ANEXOS	135

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Iniciadores evaluados para la técnica SSR.....	55
Cuadro 2. Mezcla de reacción utilizada en PCR para la técnica de SSR en el grupo de amplificación de 4 iniciadores.....	56
Cuadro 3. Mezcla de reacción utilizada en PCR para la técnica de SSR en el grupo de amplificación de 2 iniciadores.....	56
Cuadro 4. Mezcla de reacción utilizada en PCR para la técnica de SSR en los grupos de amplificación de 1 iniciador.....	57
Cuadro 5. Mezcla utilizada para la preparación de geles de poliacrilamida para preparar una placa.....	59
Cuadro 6. Cuadrados medios del error del análisis de varianza, coeficientes de variación y media de las variables registradas en el presente estudio.....	62
Cuadro 7. Correlación entre las variables analizadas en variedades nativas de maíz azul.....	87
Cuadro 8. Valores propios de funciones discriminantes canónicas de cinco grupos de variedades nativas de maíz azul.....	91
Cuadro 9. Estructura total canónica de variables discriminantes canónicas definidas a partir de cinco grupos de variedades nativas de maíz azul.....	92
Cuadro 10. Distancia estadística generalizada entre centroides de grupos.....	96

Cuadro 11. Porcentaje de homocigosis y heterocigosis, número de Bandas polimórficas y contenido de información polimórfica (PIC) para los SSR utilizados en la caracterización molecular de 175 variedades nativas de maíz azul.....	99
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Aparato liofilizador marca Labconco Frazee Dry System LYPH LOCK 4.5.....	50
Figura 2. Tejido de hojas de maíz liofilizado y molido.....	50
Figura 3. Aparato para la extracción de ADN modelo Maxwell 16 System for Genomic DNA Purification, marca PROMEGA.....	51
Figura 4. Cartucho Maxwell 16 DNA Purification. La figura muestra los contenidos del cartucho de cada una de las celdas. 1) Muestra de tejido + amortiguador de lisis, 2) “perlas” magnetizadas, 3) a 7) amortiguador de lavado.....	51
Figura 5. “Bastón” magnetizado para macerar el tejido para la extracción del DNA.....	51
Figura 6. Colocación del cartucho en una base acondicionada del aparato Maxwell 16 System for Genomic DNA Purification.....	51
Figura 7. Tubo de plástico donde finalmente queda el DNA extraído.....	52
Figura 8. Tubo Eppendorf que contiene el ADN extraído de una muestra de maíz azul.....	52
Figura 9. Espectrofotómetro modelo ND-1000 UV/Vis, marca Nanodrop.....	52

	Página
Figura 10. Cámara horizontal para electroforesis modelo SUNRISE TM 96 de Life Technologies.....	53
Figura 11. Cámara vertical para electroforesis modelo MVG-216-33 de Scientific Co.....	59
Figura 12. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor número de plantas por parcela.....	64
Figura 13. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor número de días a floración masculina.....	67
Figura 14. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor número de días a floración femenina.....	68
Figura 15. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor altura de planta.....	70
Figura 16. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor altura de mazorca.....	70
Figura 17. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor número de mazorcas por planta.....	72
Figura 18. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor peso de campo.....	73
Figura 19. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor rendimiento por planta.....	75
Figura 20. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor diámetro de mazorca.....	77
Figura 21. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor diámetro de olote.....	77
Figura 22. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor longitud de mazorca.....	79
Figura 23. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor número de hileras por mazorca.....	81
Figura 24. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor número de granos por hilera.....	81

	Página
Figura 25. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor porcentaje de grano.....	82
Figura 26. Dendograma jerárquico de 175 variedades nativas de maíz azul obtenido mediante el método de Ward y el uso de distancias euclidianas cuadradas.....	89
Figura 27. Representación gráfica de las variables discriminantes canónicas VDC 1 y VDC 2 que definen cinco grupos de las 175 variedades nativas de maíz azul.....	93
Figura 28. Representación gráfica de las variables discriminantes canónicas VDC 1y VDC 3 que definen cinco grupos de las 175 variedades nativas de maíz azul.....	94
Figura 29. Representación gráfica de las variables discriminantes canónicas VDC 2 y VDC 3 que definen cinco grupos de las 175 variedades nativas de maíz azul.....	95
Figura 30. Perfil de bandeo obtenido en los <i>loci</i> phi115, phi033, phi062 y phi051 para las 175 variedades nativas de maíz azul.....	100
Figura 31. Perfil de bandeo obtenido en los <i>loci</i> phi093, y phi085 para las 175 variedades nativas de maíz azul.....	102
Figura 32. Perfil de bandeo obtenido en los <i>loci</i> phi96342, phi448880 y phi0121 para las 175 variedades nativas de maíz azul.....	105
Figura 33. Perfil de bandeo obtenido en el <i>locus</i> phi159819 para las 175 variedades nativas de maíz azul.....	106
Figura 34. Dendograma de agrupamiento y coeficiente de similitud genética obtenido a partir de SSR's en 175 variedades nativas de maíz azul.....	114

**CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA Y MOLECULAR DE MAÍCES AZULES PARA LOS VALLES
ALTOS CENTRALES DE MÉXICO**
**AGRONOMIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BLUE MAIZE FOR THE
CENTRAL HIGH VALLEYS OF MEXICO**

Oscar Horacio Guillén Ayala¹ José de Jesús López Reynoso²

RESUMEN

México tiene amplia variabilidad genética de maíz azul (*Zea mays* L.) que se aprovecha para el consumo humano como tortillas y otros productos, además tiene potencial para la extracción de pigmentos que se emplean como antioxidantes en la industria farmacéutica. A pesar del valor alimenticio y nutracéutico que tiene este tipo de maíz, muy poco se ha hecho para desarrollar variedades mejoradas. El objetivo del presente trabajo fue realizar la caracterización agronómica y molecular de 173 variedades nativas de maíz azul de los Valles Altos Centrales de México y dos testigos, evaluando 15 variables agronómicas y 10 marcadores moleculares microsatélites (SSR). Los datos agronómicos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$), así como un análisis multivariado. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa estadístico SAS. Con los datos de SSR se hizo el análisis estadístico con el programa Sistema de Análisis Multivariado y Taxonomía Numérica (NTSYS). Los resultados no mostraron superioridad agronómica en ninguna de las variables evaluadas, lo que hubiera representado un buen ajuste de su condición genotípica y fenotípica en respuesta a las condiciones ambientales del sitio de evaluación. Los testigos mostraron un comportamiento intermedio y fueron superados por una gran parte de las variedades nativas en todas las variables evaluadas. La técnica de microsatélites resultó rápida y simple para caracterizar variedades nativas, permitiendo su identificación y agrupamiento con base en su similitud genética y detectaron polimorfismo de alelos en 10 *loci* específicos para cada una de las muestras evaluadas. La caracterización molecular y la agronómica, deben funcionar como complemento una de la otra, para establecer programas de mejoramiento genético con variedades nativas de maíz azul.

Palabras clave: Caracterización, variedades nativas, maíz azul.

¹ Tesista

² Director de Tesis

ABSTRACT

Mexico has a wide genetic variability of blue maize (*Zea mays* L.) that is taken advantage of in human consumption of tortillas and other products. In addition has potential for the extraction of pigments that are used as antioxidants in the pharmaceutical industry. Despite the nutritional and nutraceutical value that this kind of maize has, very little has been done to develop improved varieties. The objective of this work was to carry out the agronomic and molecular characterization of 173 native varieties of blue maize of the Central High Valleys of Mexico and two controls, evaluating 15 agronomic varieties and 10 microsatellites molecular markers (SSR).

The agronomic data obtained were subjected to a variance analysis and the Tukey test of mean comparison ($\alpha = 0.05$), as well as an multivariate analysis. The statistical analysis were made with the SAS statistical software. The statistical analysis of the SSR data was made with the Numerical Taxonomical System of analysis (NTSYS) statistical software.

The results did not show agronomical superiority in any of the evaluated variables, which should have represented a good adjustment of its genotypic and phenotypic condition in response to the environmental conditions of the evaluation site. The controls showed an intermediate behavior and were overcome by a high portion of the native varieties in all the evaluated variables. The microsatellites technique resulted in a fast and simple characterization of native varieties, allowing their identification and grouping based on their genetic similarity and detected polymorphism of alleles in 10 specific *loci* for each of the evaluated samples. The molecular and agronomic characterization should function as a complement, or for the other, to establish genetic improvement programs with native varieties of blue maize.

Key words: Characterization, native varieties, blue maize.

¹ Thesis writer

² Thesis director

I INTRODUCCIÓN.

México, por ser centro de origen del maíz (*Zea mays* L.), constituye una fuente de gran diversidad genética en esta especie. Esto permite contar con poblaciones de amplia variación sobre las cuales es posible aplicar programas de mejoramiento genético para elevar el rendimiento de las mismas, o el de los materiales que de ellas se derivan. Dichas poblaciones han sido la base de los principales programas de fitomejoramiento en esta especie, los cuales han puesto principal énfasis en la obtención de variedades mejoradas de grano blanco por la gran demanda de este tipo de maíz en la dieta de los mexicanos. La falta de variedades mejoradas de otros tipos de maíces, como los de grano azul, se ha debido a que dichos maíces ocupan un lugar secundario en la alimentación humana y/o animal, a pesar de que están presentes en muchas de las razas descritas en México (Ortega *et al.*, 1991).

Los maíces azules se siembran principalmente en algunas regiones de los estados de México, Puebla, Tlaxcala, Hidalgo, Morelos, Veracruz, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Chihuahua y Guanajuato. En estos estados los maíces azules se siembran en áreas pequeñas y marginadas principalmente por agricultores de bajos recursos que destinan la producción de estos maíces para autoconsumo, y cuando hay excedentes, los comercializan en los mercados regionales (Arellano *et al.*, 2003; Miguel, 2003).

Una de las áreas maiceras de mayor extensión e importancia en México es conocida como los Valles Altos Centrales de México, que comprende regiones de los estados de México, Puebla, Hidalgo y Tlaxcala, con una superficie sembrada de maíz de un millón 500 mil ha, de la cual, aproximadamente, el 85% es de temporal. Se estima que un tercio de los productores de maíz que producen en temporal siembran la tercera parte de sus parcelas con maíz azul o de otro color, lo cual representa en su totalidad una superficie de 150 000 ha, con una cosecha de 300 000 ton de grano de color, con rendimientos de 2 a 3.5 t ha⁻¹ (Miguel *et al.*, 2004).

En la actualidad, los maíces azules están adquiriendo mucha importancia en diversas regiones de los Valles Altos Centrales, por una parte debido a las características ambientales de su área de cultivo, ya que al maíz azul se le relaciona con precocidad, y por otra a que estos maíces están siendo mejor apreciados en la elaboración de alimentos típicos mexicanos como las tortillas, tlacoyos, tamales, atoles, pinole, pozole y elotes (Arreguín, 2002; Guemes *et al.*, 2002). El incremento de su consumo también se ha debido a su sabor diferente (dulce y agradable) (Guemes *et al.*, 2002; Salinas *et al.*, 1999), su atractivo color del grano (Guemes *et al.*, 2002) y a menor dureza y adhesividad de masa, así como menor tiempo de cocción de la tortilla (Rangel *et al.*, 2004). Todo lo anterior ha ocasionado un incremento en su demanda y su precio, el cual llega a ser hasta cuatro veces superior al precio del maíz blanco (Guemes *et al.*, 2002). Además, el potencial de dichos maíces se ha incrementado debido a que pueden ser fuentes importantes para la extracción de pigmentos colorantes, y actualmente se ha incrementado la demanda de pigmentos

naturales por parte de los países de la Comunidad Económica Europea (Miguel *et al.*, 2004; Guemes *et al.*, 2002; Salas, 2003). Por otro lado, los maíces azules contienen antocianinas que en la actualidad se utilizan como fuente de antioxidantes (Agama *et al.*, 2005; Espinosa, 2003). A pesar de que en México no se tenían programas de mejoramiento genético para desarrollar variedades de maíces azules, se cuenta con un amplio acervo, pero falta caracterizarlo adecuadamente para identificar y aprovechar las ventajas que cada colecta ofrece.

Dada la gran cantidad de colectas disponibles, es importante realizar su caracterización agronómica y molecular para definir qué colectas pueden ser seleccionadas con el propósito de depurar su variabilidad genética para su uso en programas de fitomejoramiento.

Con base en lo anterior, se plantearon los siguientes objetivos.

OBJETIVO GENERAL

Realizar la caracterización agronómica y molecular de 175 colectas de maíces azules para seleccionar los mejores materiales de acuerdo con su variabilidad genética e integrarlos al banco de germoplasma para formar la colección núcleo en las razas Chalqueño y Cónico.

OBJETIVOS PARTICULARES

Caracterizar agronómicamente las colectas de maíces azules para identificar materiales que presenten características agronómicas deseables.

Efectuar la caracterización molecular de las colectas seleccionadas agronómicamente por medio de la técnica molecular de SSR's.

HIPÓTESIS

A través de la caracterización morfológica y molecular se podrá detectar redundancia genética entre colecciones y se podrán diferenciar algunas para integrarlas a la colección núcleo de las Razas Chalqueño y Cónico.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen y distribución del maíz azul en los Valles Altos Centrales de México.

Los maíces azules se siembran principalmente en algunas regiones de los estados de México, Puebla, Tlaxcala, Hidalgo, Morelos, Veracruz, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Chihuahua y Guanajuato. En estas localidades, los maíces azules se siembran en áreas pequeñas y marginadas principalmente por agricultores de bajos recursos que destinan la producción de estos maíces para autoconsumo, y cuando hay excedentes, los comercializan en los mercados regionales (Arellano *et al.*, 2003; Miguel, 2003).

Una de las áreas maiceras de mayor extensión e importancia es conocida como los Valles Altos Centrales de México, que comprende regiones elevadas de los estados de México, Puebla, Hidalgo y Tlaxcala. Se denominan como Valles Altos Centrales a aquellas regiones comprendidas entre 2000 y 2800 msnm de la Mesa Central, en donde predominan condiciones como una agricultura de temporal, con una temporada de lluvias que va de regular a mala, con una irregular distribución del agua de lluvia, con la presencia de sequía intraestival, granizo, heladas tempranas y tardías, además de suelos poco fértiles, erosionados o con mal drenaje (López-Herrera, 1975).

En estas regiones, las variedades criollas de maíz azul que más se cultivan en forma comercial corresponden a las razas Chalqueño y Cónico (Herrera, 1999).

Los límites altitudinales, superior e inferior, para la raza Chalqueño son de 1900 a 2700 msnm, mientras que para la raza Cónico estos límites son un poco más amplios (1900 a 2800 msnm). Aun cuando las dos razas comparten las mismas regiones ecológicas, no compiten por el espacio (Romero, 2002).

La raza Chalqueño es la más aprovechada en los Valles Altos en terrenos que tienen facilidades de riego o reservas de humedad suficiente para la germinación de las semillas sembradas profundamente (Romero, 2002), y la raza Cónico se produce más en lugares con problemas de humedad (Silva, 1992).

Wellhausen *et al.* (1951) agrupan a la raza Chalqueño dentro de las razas modernas incipientes, como posible producto de la hibridación del Cónico y el Tuxpeño, ambas razas mestizas prehistóricas. Hay pocas características de esta raza que no sean similares a las de uno u otro de los progenitores supuestos, o bien, que sean intermedias entre ellos.

Aparentemente Chalqueño es de origen bastante reciente, por lo que no ha intervenido en la formación de otras razas de México (Miguel, 2003).

Las variedades de la raza Chalqueño son tardías, de porte relativamente alto, con mazorcas de forma piramidal y de grano dentado de coloración variable (crema, blanco, azul, amarillo y azul-negro) y están asociadas con usos antropocéntricos específicos (Herrera *et al.*, 2004). El maíz azul raza Chalqueño varía considerablemente en vigor y ciclo biológico, por ejemplo en Amecameca,

Estado de México, frecuentemente alcanza una altura de cinco metros, además las variedades más precoces presentan un período a floración masculina de 95 a 98 días y a floración femenina de 99 a 103 días (Herrera, 1999).

Los maíces azules de la raza Chalqueño se cultivan en altitudes de 1800 a 2300 metros, principalmente en los estados de México, Tlaxcala, Puebla e Hidalgo, en condiciones de temporal, humedad residual y punta de riego, donde la producción se desarrolla a partir de la tecnología y variedades de que disponen los productores, obteniendo niveles de productividad de 2 a 3.5 t ha⁻¹. (Arellano *et al.*, 2003).

La raza Cónico es un maíz precoz que se adapta en terrenos que no tienen facilidades de riego o sin suficientes reservas de humedad, y se siembra hasta el establecimiento de la temporada de lluvias (Romero, 2002). Es una de las razas que más se cultiva en forma comercial, su nombre se deriva de la forma cónica de sus mazorcas. Sus características, origen y parentesco fueron descritos en detalle por Wellhausen *et al.* (1951) quienes agrupan a esta raza dentro de las Mestizas Prehistóricas, producto de la hibridación del Palomero Toluqueño (Indígena Antigua) y el Cacahuacintle (Exótica Precolombina). Los maíces azules de esta raza de maíz se distribuyen en altitudes de 2200 a 2800 metros en los estados de México, Tlaxcala, Puebla e Hidalgo, presentándose en algunas partes de Michoacán, avanzando al norte por Querétaro, Guanajuato, Jalisco, llegando hasta Zacatecas y Chihuahua (Silva, 1992).

Apoyándose en información cariotípica, Kato (citado por Silva, 1992), propone que la raza Cónico puede haberse originado de la domesticación y evolución del teocintle de Chalco.

Las principales características de la raza Cónico son: plantas cortas a intermedias, muy precoces, de un sistema radical débil, hojas de pubescencia intermedia, espigas con muy pocas ramificaciones, la forma de la mazorca es cónica con un número promedio de 16 hileras, sus granos son medianamente pequeños, siendo largos con relación al espesor y anchura y moderadamente puntiagudos y dentados (Wellhausen *et al.*, 1951).

La raza Cónico se ha utilizado en programas de mejoramiento genético de maíz de las partes altas del país, así como en la formación de poblaciones de amplia base genética por el CIMMYT (Silva, 1992).

2.2 Características químicas del maíz azul.

La importancia del maíz azul radica en la diversidad de usos que presenta, principalmente como un componente en la dieta alimenticia de los mexicanos, y se le asocia con ritos o actos mágicos (López-Herrera, 1975). Tiene características diferentes a los demás maíces, como son un alto contenido de proteína y lisina (Bello, 2006). La lisina es un aminoácido esencial que se presenta en mayor cantidad en el maíz azul que en el maíz blanco (Johnson y Croissant, 1993); a este respecto, Miguel *et al.* (2004) mencionan que el contenido de lisina en el maíz azul es de 2.3 mg/g contra 1.4 mg/g determinado en el maíz amarillo.

Las variedades criollas de maíz azul son de endospermo harinoso (Agama *et al.*, 2005; Miguel *et al.*, 2004; Salinas *et al.*, 2003) y pocas variedades son semiharinosas (Miguel *et al.*, 2004).

El contenido de proteína del maíz azul puede llegar a ser hasta un 30% más alto que el del maíz blanco. Además, su contenido de hierro, magnesio, fósforo, cobre, zinc y potasio también supera al maíz blanco (Johnson y Croissant, 1993).

El color de los maíces azules se debe a la presencia de antocianinas que pertenecen al grupo de los flavonoides, y son compuestos solubles en agua visibles al ojo humano, poseen diversas propiedades químicas, y se pueden encontrar en cualquier parte de la planta, pero son más evidentes en frutos y flores (Arellano *et al.*, 2003; Salinas, 2000).

En la planta de maíz azul, las antocianinas están presentes en diferentes estructuras, que abarcan desde el tallo, la vaina, las hojas, inflorescencias, y en la mazorca se pueden encontrar en las brácteas, el olote y en el grano (Salinas, 2000). En este último se concentran principalmente en el pericarpio, en la capa de aleurona o en ambas estructuras (Salinas *et al.*, 1999). Las antocianinas encontradas en el maíz de grano azul derivan de cianidina y pelargonidina concentrándose principalmente en la capa de aleurona (Espinosa, 2003; Salinas *et al.*, 1999; Harbone y Gayazzi, citados por Salinas, 2000), aunque otros autores mencionan también la presencia de peonidina y malvidina (Caldwell y Peterson, citados por Salinas, 2000), así como delphinidina (Bustillos, citado por Salinas 2000).

En los maíces de color azul, el contenido total de antocianinas en el pericarpio y aleurona varía de 29 a 46 mg en 100 g de muestra (Salinas *et al.*, 2003), presentando mayor concentración en la capa de aleurona, donde exhibe una actividad antioxidante (Espinosa, 2003). Los maíces azules tienen potencial

de uso industrial debido a que las antocianinas poseen propiedades químicas relacionadas con la reducción del colesterol y triglicéridos del torrente sanguíneo (Maltros *et al.*, 1999).

Además pueden aprovecharse como fuente de pigmentos colorantes, lo que posibilita sus usos en el desarrollo de las industrias de alimentos, cosméticos y farmacéuticos (Miguel *et al.*, 2004; Guemes *et al.*, 2002; Salas, 2003, Salinas *et al.*, 2003).

2.3 Características agronómicas del maíz azul.

En la actualidad, ya se tienen las primeras variedades mejoradas de maíz azul por parte del INIFAP, como la variedad V-39 “Cocotitlán” para la región de temporal de Chalco-Amecameca del Estado de México y la variedad V-45 “Sierra Negra” de madurez tardía para la región de Serdán-Tlachichuca-El Seco del estado de Puebla (Arellano, 2006); pero aún no se tiene un paquete tecnológico para el manejo agronómico del cultivo de maíz azul para los Valles Altos Centrales, que considere fechas de siembra, densidad de población, fórmulas de fertilización química y orgánica y control de malezas y plagas; tampoco se cuenta con la información relacionada con los valores culturales y tradicionales que los agricultores tienen asignados a esos maíces (Arellano *et al.*, 2003).

En Chapingo se han desarrollado ya los primeros híbridos de maíz azul cuya productividad es equiparable a la de los híbridos de maíz blanco recomendados para esta región, son de porte bajo, resistentes al acame y con

mayor rango de adaptación que las variedades nativas, pero de calidad comparable con la de éstas[‡].

De acuerdo con el manejo agronómico que le dan los productores, el maíz azul tiene la capacidad de lograr un rendimiento de 5 a 7 t ha⁻¹, siempre que el manejo del cultivo, durante la fase vegetativa hasta la floración esté bien controlado, ya que tienen adaptabilidad para ser cultivados en cualquier región de los Valles Altos y sin presentar diferencias con el maíz blanco (Miguel, 2003). Sin embargo, muestran problemas agronómicos relacionados con el acame de la planta que varía entre un 25 y 30% (Arellano *et al.*, 2003). La falta de resistencia al acame da por resultado una baja en la calidad de semilla, disminución del rendimiento y mayores dificultades en la cosecha (Jugenheimer, 1988). Probablemente las enfermedades y los insectos sean los principales responsables de los rompimientos del tallo y debilitamiento de la raíz. Por ejemplo, organismos patógenos como *Diplodia zeae* y *Gibberella zeae* causan la pudrición y la caída del tallo (Miguel, 2003).

Otra posible causa del acame es que las variedades criollas de maíz azul desarrollan un tallo muy alto; esto aunado a mayores contenidos de agua y raíces más cortas de poca profundidad, impide soportar la presencia de vientos fuertes antes de la antesis (Arellano *et al.*, 2003).

Victores (2001) menciona que el cultivo del maíz azul en México, no muestra gran diferencia en su sistema de producción con relación al maíz blanco o de otros colores. Lo más importante para su producción es sembrarlo

[‡] Dr. José de Jesús López Reynoso, comunicación personal, 2008.

oportunamente y brindarle un adecuado manejo agronómico. Los agricultores de los municipios de Texcoco, Papalotla, Chiconcuac, Chiautla, Tepetlaoxtoc y Tezoyuca, del Estado de México, mencionan que el cultivo de maíz azul requiere de mayor humedad y nutrientes para su desarrollo y que su cosecha es más temprana que la del maíz amarillo, pero presenta mayor índice de daño por plagas en campo y almacén porque su semilla es muy harinosa.

El maíz azul, es dañado con facilidad por gorgojos, y debido a la falta de medios económicos la superficie de siembra es reducida; además, por la falta de información técnica, los agricultores lo manejan con base en conocimientos empíricos (Miguel, 2003).

Taboada (2000), comenta que en varias regiones del estado de Puebla, los maíces azules se siembran en pequeñas extensiones. Por lo general, el rendimiento de grano que alcanzan es inferior al producido por los blancos; esto se debe a su mayor precocidad y al menor peso del grano.

La siembra de maíces azules se realiza entre los meses de marzo a junio. La mayor parte de productores siembra en abril. La cosecha se efectúa entre noviembre y diciembre, aunque en algunos casos puede ser en septiembre y octubre. El rendimiento promedio por hectárea es de 1.5 t ha^{-1} (Álvarez, 2004).

2.4 Usos del maíz azul.

El pueblo mexicano utiliza todas las partes del maíz. Estos usos se dan de igual manera para el maíz azul. El grano es el que presenta el mayor número de usos, siguiendo en importancia el tallo, el olote, las hojas, las inflorescencias y finalmente la raíz (Hernández, 1981).

En la región central de México, desde hace mucho tiempo, el consumo de tortillas de maíz azul ocurre en comunidades y pueblos durante festejos especiales (López-Herrera, 1975). Sin embargo, es cada vez más frecuente que los comercios expendan tortillas de maíz azul durante toda la semana, generalmente a un precio superior al de las tortillas de grano blanco. Por otra parte, los maíces azules están siendo mejor apreciados en la elaboración de alimentos típicos mexicanos, como las tortillas, tlacoyos, tamales, atoles, pinole, pozole y elotes (Arellano *et al.*, 2003, Arreguín, 2002; Guemes *et al.*, 2002). Adicionalmente, su consumo se basa en un sabor diferente (dulce y agradable) (Guemes *et al.*, 2002; Salinas *et al.*, 2003), su atractivo color del grano (Guemes *et al.*, 2002) y una menor dureza y adhesividad de masa y menor tiempo de cocción de la tortilla (Rangel *et al.*, 2004). Todo esto ha ocasionado un incremento en su demanda alimenticia y en su precio, el cual se llega a elevar hasta cuatro veces más respecto al del maíz blanco (Guemes *et al.*, 2002).

Varios autores han señalado los usos, sobre todo alimenticios, que se le dan al maíz azul en diversas regiones de los Valles Altos Centrales. Por ejemplo, en varias localidades del estado de Puebla se usa principalmente para la elaboración de tortillas y, además, se emplea como alimento para los animales. Otros usos variados, es hacer pinole y atole (dado que es un maíz muy suave y se adapta muy bien a la molienda), elotes, tamales, hojas de tamal, dulces y gorditas. El pinole elaborado de maíz azul tiene demanda por su color atractivo y buen sabor, con la ventaja de que se puede guardar durante mucho tiempo (Álvarez, 2004).

En los Valles Altos de Puebla, el uso más importante que tienen estos maíces es la obtención de elotes; además, se utilizan para la producción de harinas para atoles y, al cosechar el grano, para la elaboración de tortillas caceras que son muy apreciadas en la mesa de los productores de la región (Taboada, 1996).

Para preparar comida, harina y otros productos se muele el maíz azul usando un molino; los granos enteros esencialmente se utilizan para producir diversos alimentos (Hallauer, 2001).

El atole de maíz azul se hace de masa cocinada pero en algunos casos se realiza con los granos secos. El pinole es una mezcla hecha de la combinación del maíz azul tostado y molido con canela, azúcar, miel y otros ingredientes, se consume directamente o se mezcla con agua o leche (Dickerson, 1990).

Los maíces azules se aprovechan principalmente en la elaboración de productos nixtamalizados, sin embargo, se requiere que las antocianinas que contiene el grano no se destruyan durante este proceso, con objeto de obtener productos teñidos de manera natural, por lo que es importante seleccionar maíces que preserven el color durante la nixtamalización y además que reúnan las características físicas de grano necesarias para la elaboración de tortillas y frituras (Salinas, 2000).

Cuando el maíz azul se emplea para consumo animal se usa el grano entero, el rastrojo y el forraje verde; los maíces de color azul producen entre 180 y 250 pacas de rastrojo por hectárea, lo que representa un ingreso adicional para los productores (Miguel, 2003).

El maíz azul está incrementando su importancia en la industria de la transformación debido a que presenta mayor calidad de proteínas y a sus propiedades antioxidantes debidas a la presencia de antocianinas; adicionalmente se esta utilizando para la elaboración de botanas, como alimento en hojuelas de maíz y cereal (Arellano *et al.*, 2003; Martínez y Zazueta, 2003).

La demanda de dichos maíces se ha incrementado también debido a que pueden ser fuentes importantes para la extracción de pigmentos, que se pueden aprovechar como colorantes de vino, mermeladas y jugos de fruta, sobre todo tomando en cuenta la creciente demanda de pigmentos naturales por parte de los países de la Comunidad Económica Europea (Miguel *et al.*, 2004; Guemes *et al.*, 2002; Maltros *et al.*, 1999; Salas, 2003; Salinas *et al.*, 2003). Por otra parte, debido a su alto contenido de antocianinas, actualmente se utilizan como fuente de antioxidantes naturales (Agama *et al.*, 2005; Espinosa, 2003; Salinas *et al.*, 2003) ya que tienen la capacidad de atrapar radicales libres, los cuales ocasionan daño a biomoléculas (Bello, 2006). También, estos antioxidantes tienen la ventaja de emplearse como una película biopolimérica para evitar la oxidación de alimentos (Tinoco y Rojas, 2006).

Salinas (2000), menciona que de su almidón se obtienen pegamentos, detergentes, colorantes, insecticidas y pinturas; de la fécula se producen películas para fotografía, plásticos, triplay y neumáticos; del etanol se extraen licores y combustibles y de la fructosa se obtienen alimentos como jugos, frutas enlatadas, refrescos, vinos y conservas.

Adicionalmente las antocianinas del maíz azul poseen propiedades químicas relacionadas con la reducción del colesterol y triglicéridos del torrente sanguíneo, que a su vez reducen las afecciones cardíacas (Maltros *et al.*, 1999).

2.5 Industrialización del maíz azul.

En cuanto al proceso de nixtamalización, la dureza del endospermo determina en parte la velocidad de penetración del agua durante el cocimiento, por lo que el tiempo de nixtamalización se da en función del índice de flotación; así los maíces azules requieren menor tiempo de cocción (Rangel *et al.*, 2004).

Las botanas derivadas del maíz son las que han presentado un mayor crecimiento en los últimos años, debido a su sabor característico a "tortilla". La elaboración de botanas a partir de maíz azul, tiene un mercado potencial como alimento nutracéutico debido a su mayor calidad en proteínas y a sus propiedades antioxidantes asociadas al contenido de antocianinas (Martínez y Zazueta, 2003).

La industria de las frituras ha establecido que los mejores maíces para este proceso son los de textura dura; no obstante, estudios realizados por Plascencia (1998) muestran que las frituras de maíz azul harinoso fueron de mejor sabor y de color más estable.

El valor alimenticio de los granos azules con endospermo harinoso es más alto que el de granos de maíz amarillo o blanco (Moreno, 2005). Se ha encontrado que el contenido de lisina en 5 g de maíz azul fue de 2.3 mg g⁻¹, comparado con 1.4 mg g⁻¹ de maíz amarillo (Miguel, 2003).

En general, la proteína y el contenido mineral del maíz azul son más altos que en la mayoría de los granos de otros colores; además, contiene niveles más altos de flavonoides que se utilizan actualmente como fuentes de antioxidantes en los alimentos (Miguel, 2003); no obstante que los maíces azules tienen estas ventajas alimenticias, su demanda obedece a su color azul y su sabor diferente (Dickerson, 1990).

2.6 Aspectos genéticos que interfieren en la coloración del grano de maíz azul.

El color de los granos de maíz es muy variado y está controlado genéticamente. Los pigmentos primarios responsables de la coloración azul del grano en maíz son las antocianinas, que se encuentran en la capa externa del endospermo conocida como aleurona y en el pericarpio (López-Reynoso, 2007).

Las antocianinas representan los pigmentos rojos y morados más generalizados en el reino vegetal. En el caso del maíz están presentes en diferentes estructuras que abarcan desde el tallo, la vaina, las hojas, inflorescencias, y en la mazorca se pueden encontrar en las brácteas, el olote y en el grano (Salinas, 2000). Según Coe (1985), son alrededor de 20 loci los que afectan directamente la distribución cualitativa y cuantitativa de las antocianinas en los tejidos de la planta del maíz. En el tejido de la aleurona la formación de antocianinas color púrpura requiere la presencia de los genes A_1 , A_2 , An_1 , Bz_1 , Bz_2 , C_2 , C_1 , Dek_1 , In , Pr , R y Vp_1 . Los primeros cinco genes son estructurales y su función es codificar las enzimas requeridas en la ruta metabólica de la

síntesis de antocianinas. Sin embargo, la expresión de estos genes es regulada, principalmente a nivel de la activación de la transcripción, por lo menos por dos grupos de genes reguladores, entre los que se encuentran alelos de la familia de genes *c1/pl1* y alelos de la familia *r1/b1*, los cuales son responsables de la pigmentación en tejidos de plantas y semillas (Coe *et al.*, 1988; Cone, citado por López-Reynoso, 2007). Todos estos genes han sido clonados y caracterizados. Por ejemplo, *A₁* codifica para la dihidroflavonol reductasa, *A₂* para la flavan-3-hidroxilasa, *Bz₁* para UDP-glucosa: flavonoide-3-O-glucosil transferasa, *Bz₂* se desconoce su función, aunque el cDNA ha sido clonado; *C₂* codifica para un factor de transcripción (Cone, citado por López-Reynoso, 2007). La secuencia disponible de estos genes permite diseñar iniciadores para detectar su presencia de forma directa y certera por PCR sin necesidad de usar marcadores ligados y con mayor certeza, incluso en el caso de que se trate de alelos que difieran en sólo una base. Respecto al par de genes reguladores *c1/pl1*, el gen *c1*, cuya expresión está regulada a su vez por el gene *vp1*, induce la pigmentación únicamente en algunos tejidos de las semillas, como en la aleurona y el embrión, mientras que *pl1* regula la pigmentación en tejidos de la planta, como órganos florales, plúmula, tallo, hojas y el pericarpio de las semillas, el cual es derivado del integumento del ovario. Los genes *c1* y *pl* probablemente se originaron de una mutación por duplicación, ya que comparten regiones idénticas de codificación y quizá funcionen de forma equivalente (Cone, citado por López-Reynoso, 2007). El segundo grupo en genes reguladores, la familia de genes *r1/b1*, consiste de genes altamente homólogos que codifican proteínas similares, aunque

estructuralmente muy diferentes. Probablemente los miembros de la familia de genes *r1/b1* se derivaron de un gen ancestral único a través de una serie de duplicaciones de dicho gen (Chandler *et al.*, citado por López-Reynoso, 2007). Por lo tanto la activación de la síntesis de antocianinas requiere de *c1* (en la semilla) o *pl1* (en la planta), mientras que los genes *r1/b1* regulan la distribución de pigmentos en los diferentes tejidos de la planta.

El par de alelos *Pr-pr* controla el nivel de oxidación de las antocianinas en la aleurona del grano de maíz. De tal manera que el color púrpura de la aleurona en líneas *Pr*, se ha identificado como glucósido de cianidiana, mientras que en líneas *pr*, el color rojo se debe a la pelargonidina; por lo tanto, en plantas con el alelo *pr* en condición homocigótica, presentan la aleurona roja, pero si los loci *bz1* o *bz2* son homocigotos, el color púrpura se torna en color bronce. Si cualquiera de los alelos *a₁*, *a₂*, *an₁*, *c₁*, *c₂*, *dek₁*, *r* o *vp₁* se encuentran en homocigosis, el color está ausente. La producción de pigmentos (púrpura, rojo, bronce) se incrementa en presencia del alelo *in* en estado homocigótico. Genotipos con todos los genes de color presentes, pero con las siguientes combinaciones de los genes modificadores del color (*pr* e *in*) pueden presentar los siguientes fenotipos: púrpura claro (*Pr- In-*), púrpura intenso (*Pr- in in*), rojo claro (*pr pr In-*) y rojo intenso (*prpr inin*).

Efectos de dosis a los observados en la coloración del endospermo pueden encontrarse para la concentración de antocianinas en la aleurona con los alelos *A₁*, *C₁*, *C₂* e *In* (Coe *et al.*, 1988).

2.7 Interacción genotipo ambiente.

La interacción genotipo ambiente es una fuente de variación empleada para delimitar áreas geográficas en las cuales el desarrollo de determinadas variedades es mejor. El término interacción significa la acción conjunta de dos o más factores, la modificación del efecto por la acción de un factor o varios factores (Durán y Sahagún, 1992).

Cruz (1989) define como interacción genotipo-ambiente al comportamiento diferencial de un grupo de genotipos probados en diversos ambientes, entendiendo por ambiente al complejo climático y de prácticas culturales que actúa sobre el genotipo.

Brauer (1980), señala que el rendimiento depende de la capacidad de las plantas de aprovechar las condiciones del ambiente. Las variaciones hereditarias y las del ambiente en que viven las plantas, no son completamente independientes unas de otras y con frecuencia tienen interacciones que se manifiestan en la planta. Las variaciones hereditarias se deben a que las plantas tienen caracteres genéticos diferentes, las cuales se pueden observar cuando se cultivan distintas variedades o especies bajo condiciones similares.

Bucio (1969), menciona que las diferencias en la producción que se observan en los individuos dependen de dos factores: uno genético y otro ambiental, y que cualquier cambio, cualitativo o cuantitativo en uno o ambos factores, producirá un efecto fenotípico diferente.

Las variaciones hereditarias pueden ser simples o fácilmente observables, como los caracteres de las semillas, pero las hay también complejas, como lo es el rendimiento de grano, que es un carácter de naturaleza cuantitativa que

depende de muchos procesos vitales dentro de la planta y de la interacción de éstos con el ambiente. Algunos genes que influyen en la capacidad de rendimiento pueden tener mayores efectos que otros, los genes pueden ser diferentes en su grado de dominancia, pero en la capacidad de rendimiento influye mucho más el ambiente que en los caracteres cualitativos (Pohelman, 1985).

Para Carballo y Márquez (1970) la interacción genotipo-ambiente es una fuente de variación que debe ser investigada con el objeto de diseñar metodologías de prueba, análisis y selección, que permitan identificar aquellos genotipos que debido a una menor interacción con el ambiente tengan mejor adaptación, o bien para delimitar áreas geográficas en las cuales la adaptabilidad de determinadas variedades sea mejor.

Sahagún (1992a) enfatiza que en un sentido estricto, es la interacción entre genotipos y ambientes lo que hace posible la expresión de los genes. Es decir, en cada individuo un carácter dado se presenta con una intensidad que depende enteramente de la interacción, y al introducir mejoras en el ambiente, la interacción se intensifica positivamente y la expresión del carácter se acentúa.

La relación que guarda el maíz con su entorno, desde un punto de vista evolutivo le dio a éste una gran variabilidad, a tal grado que se sigue intentando delimitar geográficamente esa relación, por lo que Castillo (1993) indica que aún es necesario investigar sobre la manera en que cada raza o población está asociada a cierta condición ambiental. De conocer lo anterior, se podrían dirigir estudios sobre la evolución de la especie y su distribución geográfica a través

del tiempo. Con lo cual se pudiera explicar la fácil movilidad a través de ciertas condiciones ambientales, como el caso de las razas Chalqueño y Cónico.

Sahagún (1992b) señala que en la evaluación de genotipos, dos de los factores que más dificultan su interacción han sido la heterogeneidad del suelo y la interacción genotipo-ambiente.

Allard (1975), divide a las variaciones del medio en predecibles e impredecibles, siendo predecibles todas aquellas características permanentes del ambiente; como caracteres generales del clima, tipos de suelos, etc., en tanto que las impredecibles son todas aquellas fluctuaciones del clima, tales como cantidad y distribución de lluvias y temperaturas. Denomina a una variedad como “buena amortiguadora” o con “buena flexibilidad” cuando puede ajustar su condición genotípica y fenotípica en respuesta a situaciones transitorias del ambiente y distingue dos tipos de flexibilidad mediante las cuales una variedad puede tener estabilidad: 1) flexibilidad individual, cuando los individuos por si mismos pueden tener una buena flexibilidad, de tal forma que cada miembro de la población tiene buena adaptación a cada rango de ambiente, y 2) flexibilidad poblacional, que surge de las interacciones de diferentes poblaciones coexistiendo, cada una de ellas adaptadas a determinados rangos de distinto ambiente.

Eberhart y Russell (1966), establecen que la estratificación de los ambientes ha sido efectiva en la reducción de la interacción genético ambiental, ya que con esta estratificación se subdivide a una región en microdiferencias ambientales como gradiente de temperatura, distribución de la precipitación pluvial y tipos de suelos.

2.8 Caracterización de especies vegetales.

La diversidad genética de las plantas generada a partir de la evolución, hibridación, selección natural y manipulación humana proporcionan la base para la producción mundial de alimentos. Esta diversidad es amenazada por la pérdida de su hábitat, el desarrollo y crecimiento de la población humana, y otros factores; por lo que su conservación adquiere cada vez mayor importancia a nivel mundial y demanda preocupación por mantener el mayor número de especies conservadas no sólo en su centro de origen, sino también en aquellos lugares donde su uso tiene importancia o potencial (Castillo, 1996).

El manejo de fuentes genéticas de plantas implica su conservación, que incluye la adquisición o aseguramiento del germoplasma, *in situ* o *ex situ*, el monitoreo y la protección del mismo en reservas, propagación mientras se preserve su perfil genético original, así como el monitoreo de su variabilidad y sanidad en almacén.

El principal objetivo de conservar el germoplasma es dar un uso adecuado y oportuno al material genético conservado, para tal propósito es necesaria la correcta clasificación y caracterización de los individuos (Tapia, 2007) en donde se consideren el registro de rasgos morfológicos y moleculares altamente heredables para taxonomía, genética y otros propósitos de manejo (Bretting y Widrlechner, 1995; Castillo, 1996).

La conservación y el incremento en la utilización de recursos genéticos de plantas cultivadas requieren de una caracterización y clasificación detallada de la diversidad genética. La falta de marcadores morfológicos confiables resulta

en dificultades para la distinción e identificación de colecciones de germoplasma (Bhat *et al.*, 1995).

2.9 Huellas genómicas.

Las huellas genómicas (DNA fingerprinting) hacen referencia a la identidad genética de un organismo (parecido al código de barras), y se representan por la fotografía de los perfiles de DNA obtenidos con electroforesis, aunado al peso molecular de cada una de las bandas (Valadez, 2006).

Las huellas genómicas en plantas pueden ser de utilidad para numerosas aplicaciones y usos, incluyendo la identificación de individuos dentro de una misma especie o para clarificar errores en nomenclaturas de accesiones y cultivares. Son muy útiles para estudios de diversidad genética dentro de poblaciones a mejorar en cualquier cultivo, una vez que la identificación de los individuos ha sido establecida. Existen variadas técnicas moleculares y procedimientos que pueden ser usados para detectar huellas genómicas en plantas, cada una teniendo sus propias ventajas y desventajas de acuerdo al uso y objetivo para el cual se necesite (Sun *et al.*, 2001).

Valadez (2006) propone que los principales usos de las huellas genómicas en la Agronomía son: a) Identificación de variedades, cultivares y líneas mejoradas, b) Estimación de relaciones genéticas, c) Caracterización de híbridos, d) Introgresión de caracteres de mejoramiento genético, e) Análisis de ligamiento, f) Aislamiento de genes, g) Determinación de relación familiar, h) Variación genética, i) Análisis de poblaciones, j) Análisis de pedigrí, entre otros.

2.10 Tipos de Marcadores.

Los marcadores son las características distintivas de un organismo o una población que se manifiestan de manera constante, aspecto en que se basa la selección de individuos deseables en el mejoramiento genético. Los aspectos ideales para un marcador son: a) polimorfismo, b) herencia mendeliana y no epistásis, c) insensibilidad a la influencia de efectos ambientales, d) ausencia de efectos en el desarrollo de la planta, es decir, comportamiento neutro, e) simplicidad en la identificación y análisis, f) codominancia y, g) posibilidad de detección en las primeras fases del desarrollo de la planta (De Viene, 2003).

La identificación de genotipos y su descendencia se ha basado fundamentalmente en marcadores de tipo morfológicos. En la actualidad existen varios tipos de marcadores para apoyar esta identificación y selección, considerando no solo aspectos morfológicos. Pero, existen otros tipos de marcadores para apoyar esta identificación y selección, tales como los bioquímicos y moleculares. A continuación se describen algunas de las técnicas que apoyan la búsqueda de diferentes tipos de marcadores para la identificación y selección de genotipos.

2.10.1 Marcadores morfológicos.

Los caracteres morfológicos de los organismos son el primer indicador visible para la identificación y diferenciación de genotipos, aspecto que es cuidadosamente estudiado en el área del mejoramiento genético para la selección adecuada de vegetales y animales. Los rasgos morfológicos son los marcadores más antiguos y ampliamente usados, y éstos pueden ser óptimos

para ciertas aplicaciones en el manejo de germoplasma. Su principal ventaja es la simplicidad, rapidez y bajo costo (Bretting y Widrlechner, 1995); sin embargo, su empleo es limitado debido a que suelen presentar dominancia, pleiotropía, epistásis e incluso algunos son deletéreos, además de que son influenciados por el ambiente (Tapia, 2007).

Para el caso de especies vegetales la descripción morfológica se realiza cuando se hacen estudios de evolución y de relaciones filogenéticas, mientras que para los fitomejoradores, esta descripción es muy importante para seleccionar aquellos materiales en que estas características sean más deseables (Tanksley *et al.*, 1989).

En el caso del maíz, la identificación de caracteres morfológicos o indicadores para la identificación de variedades criollas, se obtienen mediante la descripción varietal con el muestreo de una población. Actividad muy importante para el fitomejorador, que se realiza para reunir, controlar y garantizar la pureza genética de cada variedad.

En los programas de mejoramiento genético la descripción varietal debe hacerse de manera muy cuidadosa para controlar el comportamiento de los caracteres fenotípicos, principalmente en la etapa de selección de variedades cuando las diferencias entre ellas no son muy marcadas.

Muñoz (1983) define como descripción varietal al conjunto de observaciones que permiten distinguir y caracterizar a una población de plantas que constituyen una variedad, mientras que Poey (1980) lo interpreta como una fotografía por escrito de las características morfológicas de la variedad en

donde el fenotipo observado está en función del genotipo y su expresión de acuerdo a las condiciones ambientales.

Carballo (1995) indica que los caracteres descriptivos de los materiales vegetales se agrupan en fijos y variables. Los fijos o cualitativos son caracteres basados principalmente en la forma y color, ya que se encuentran determinados por uno o pocos genes, por lo que su expresión está poco influenciada por el ambiente; por ejemplo, los colores de grano en maíz. El mismo autor menciona que los caracteres cuantitativos son rasgos con control poligénico, es decir, para su expresión interviene la interacción de muchos genes, se manifiestan genotípicamente como una distribución continua y son muy influenciados por efectos del ambiente.

2.10.2 Marcadores bioquímicos.

Los marcadores bioquímicos tienen como principio el análisis de isoenzimas o proteínas de reserva de la semilla a partir de la separación de los polipéptidos por electroforesis (Bassini, 1976).

El uso de proteínas de reserva para estudiar la diversidad genética se basa en el hecho de que las proteínas de almacenamiento de diferentes individuos, poblaciones y especies son homólogas, y que al separarse en un gel producirán bandas similares o diferentes. Debido a que esta clase de proteínas de reserva carecen de actividad enzimática, son detectadas en el gel por medio de técnicas generales de tñido (Becerra y Paredes, 2000).

Estudios genéticos han demostrado que los perfiles de bandas de las proteínas de reserva son heredados como características discretas y en forma

codominante (Leonard *et al.*, 1988). El número de genes que controlan estas características es reducido y varía de acuerdo a la especie (Gepts, 1990). Como marcador bioquímico las proteínas de reserva tienen una baja influencia ambiental (Gayler y Sykes, 1985), además permite un análisis rápido de decenas de muestras por ser una técnica simple y de bajo costo comparado con otras.

El polimorfismo de las proteínas de reserva en semillas ha sido utilizado para identificar y distinguir genotipos cultivados y silvestres en numerosas especies, tales como maíz (Wilson, 1985), frijol (Gepts y Bliss, 1986), trigo (Meachman *et al.*, 1978), cebada (Nebo *et al.*, 1983) y chícharo (Casey *et al.*, 1986).

Con el avance tecnológico ocurrido en los años 70's del siglo pasado, el uso de geles de almidón y la tinción histoquímica de las proteínas, se demostró la existencia de las isoenzimas dentro de un organismo, formas moleculares múltiples que catalizan una misma reacción (Becerra y Paredes, 2000).

El análisis de las isoenzimas tiene ventaja sobre el uso de los marcadores morfológicos, debido a que permite un examen rápido de decenas de muestras por ser un método rápido sencillo, fácil de aplicar, de bajo costo y muy confiable. Sus diferencias pueden apreciarse después de la separación de acuerdo a su peso molecular por electroforesis en un gel de poliacrilamida o almidón. Después de la incubación con el sustrato cromogénico, las bandas indicaran la posición donde se localizó la actividad específica, de esta manera pueden diferenciarse las isoenzimas (Winter y Kahl, 1995). Sin embargo, la reproducibilidad depende del estado de desarrollo y de la clase de tejido vegetal

que se utilice para el análisis (Becerra y Paredes, 2000). Esta técnica no detecta mutaciones silenciosas que pueden incluir sustituciones, inserciones y pérdidas de nucleótidos, o diferencias que pueden ser causadas por modificaciones pre y postranscripción y/o transducción (De Loose y Gheysen, 1995).

Generalmente la expresión alélica de las isoenzimas es codominante, lo que permite establecer comparaciones entre especies, poblaciones y detectar la presencia de híbridos e introgresión de genes (Paredes y Gepts, 1995); entre otras cualidades es que se requiere mínima cantidad de material de estudio y no interfieren los efectos epistáticos (Tanksley y Orton, 1983). Las principales limitantes que presenta esta técnica es que detectan bajo nivel de polimorfismo, que las proteínas pueden ser afectadas cualitativa y cuantitativamente en su nivel de expresión por factores ambientales, que pueden o no reflejar los cambios genéticos que ocurren en el DNA, y finalmente, que sólo un grupo de genes estructurales representados en ellas, por lo que sólo parte del genoma se puede evaluar (Becerra y Paredes, 2000). Se han utilizado ampliamente en los programas de mejoramiento genético para la generación, evaluación y selección de genotipos deseables, para la identificación de variación genética de poblaciones, para establecer relaciones filogenéticas (Valverde y Paredes-López, 1996), así como en la construcción de mapas genómicos de especies vegetales, incluyendo algunas de importancia agronómica como el jitomate (Tanksley y Rick, 1980), centeno (Wehling *et al.*, 1985) y garbanzo (Kazan *et al.*, 1993) y en la diferenciación varietal en maíz (González de León *et al.*, 1995).

2.10.3 Marcadores moleculares.

Los marcadores moleculares representan variación genética permitiendo estimar parentesco entre diferentes genotipos y, consecuentemente, predecir cuales apareamientos producirán nuevas y superiores combinaciones de genes. Los principales usos de manera general son: hacer mapas genómicos, análisis de germoplasma como nuevas fuentes de variación, identificación de genotipos, detección de híbridos y determinación de rangos de autocruzas, análisis de pedigrí, etiquetado de genes que controlan caracteres de importancia comercial, elaboración de mapas de loci con rasgos cuantitativos, estudios de introgresión de genes, población genética y estudios taxonómicos y expansión del conocimiento sobre la estructura del genoma (Doyle y Doyle, 1990). Todos los marcadores moleculares pueden apoyar en la caracterización del germoplasma efectuando la identificación de genotipos duplicados dentro de una colección, la determinación del perfil genético o genotipos (huellas genómicas), análisis de la variabilidad genética de una colección particular y el establecimiento de colecciones núcleo (Castillo, 1996).

Valadez (2006) menciona que las propiedades deseables de los marcadores moleculares deben ser: a) fácil acceso a cientos de caracteres (a veces miles) en un corto período de tiempo, b) alto nivel de polimorfismo, c) herencia codominante, d) designación no ambigua de alelos (son dominantes o codominantes), e) ocurrencia frecuente en el genoma (muy abundantes), f) comportamiento neutral (no son influidos por el ambiente), g) ensayos rápidos y fáciles y h) Alta reproducibilidad.

En la actualidad existen diversos tipos de marcadores moleculares y de acuerdo a sus propiedades se pueden agrupar en tres categorías. La primera de ellas se basa en la hibridación tipo “Southern” que tiene la finalidad de explorar las variaciones en la longitud de los fragmentos del DNA ocasionados por la acción de una enzima de restricción utilizando sondas marcadas de DNA homólogas o heterólogas. En esta categoría se incluyen a los RFLP que son polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción y los VNTR como repeticiones seriadas de número variable, que consisten básicamente de dos tipos: los minisatélites y los microsatélites. Los minisatélites son loci que corresponden a secuencias de DNA de 10 a 35 pb repetidas en tándem a lo largo del genoma. Estas secuencias se caracterizan porque contienen regiones ricas en G-C. Los microsatélites son más pequeños que corresponden a repeticiones en tándem de secuencias de DNA de 2 a 10 pb como unidad básica. Ambos tipos de polimorfismo de repetición presentan dos características que los hacen ideales para su uso. En primer lugar, están distribuidos de forma casi homogénea por todo el genoma de los eucariontes y en segundo lugar, presentan un número elevado de alelos distintos (tantos como repeticiones se presenten) (Valadez y Kahl, 2005). La segunda categoría está basada en la tecnología de PCR y agrupa diferentes técnicas; pero, todas ellas requieren de un DNA molde y otros reactivos necesarios para la obtención exponencial de fragmentos discretos de DNA, los cuales son seleccionados y reproducidos mediante moléculas iniciadoras aleatorias, semiespecíficas o específicas. Por ejemplo, los RAPD’s detectan el polimorfismo en segmentos de DNA amplificados aleatoriamente, los AFLP’s detectan polimorfismos en la longitud

de fragmentos selectivamente amplificados, los CAPS que representan secuencias polimórficas amplificadas y cortadas, o los SSR's o microsatélites que refieren a secuencias simples repetidas a lo largo del genoma. La tercer categoría incluye técnicas que combinan las dos categorías anteriores: PCR e hibridación molecular; como la técnica de Microsatélites polimórficos amplificados al azar (RAMPO) (Karp *et al.*, 1997; Valadez y Kahl, 2005).

Debido a la gama de técnicas existentes, un problema al que comúnmente se enfrenta el investigador, es el definir la más adecuada para aplicarla en un objetivo particular; para lograr esto, se requieren varios criterios para definirla, como son: el tipo de información que se busca; por ejemplo, si se trata de un estudio de historia de la población, o si se trata de diferenciar entre materiales o determinar el nivel de variación existente; el grado de discriminación que se requiere dentro de una población, entre especies, entre géneros, etc.; el número de loci a explorar; la cantidad de recursos con que se dispone, así como el tiempo que requiere la técnica o técnicas seleccionadas (Karp *et al.*, 1997).

2.10.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En 1985, el Dr. Mullis desarrolló un método de amplificación de DNA, que permitió producir grandes cantidades de uno o más fragmentos específicos (productos amplificados) a partir de regiones específicas de DNA molde o de RNA seguido de transcripción inversa (Mullis, 1990). A este método lo denominaron Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR: Polimerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) (White, 1996).

En años recientes se ha reconocido que marcadores de DNA basados en PCR son una poderosa herramienta para la caracterización y análisis genéticos, así como para programas de mejoramiento por su simplicidad y facilidad de manejo (Kojima *et al.*, 1998).

Para obtener moléculas de DNA, el método de PCR requiere de DNA molde, iniciadores (oligonucleótidos) específicos, semiespecíficos o aleatorios que complementan ambas hebras del segmento de DNA y del resto de los reactivos que de manera rutinaria se adquieren en las diferentes compañías. La reacción para la síntesis se efectúa mediante ciclos térmicos secuenciales (temperatura y tiempos específicos) en el termociclador, donde cada uno consta invariablemente de tres pasos: 1) Desnaturalización, permite la separación de las dos hebras de DNA por el rompimiento de los enlaces que las unen, 2) Alineamiento, los iniciadores identifican secuencias complementarias en el DNA molde y se realiza el apareamiento, y 3) Extensión, donde la Taq DNA polimerasa incorpora los dNTP's libres a partir del extremo 3' de los iniciadores permitiendo su extensión y por lo tanto la nueva cadena de DNA (Valadez y Kahl, 2005).

Con la PCR es posible detectar diferencias en la secuencia nucleotídica de los fragmentos amplificados de los individuos en estudio. Estas diferencias se pueden deber a cambios de una o más pares de bases en el sitio de unión de los iniciadores o a cambios estructurales mayores que modificarían la distancia de unión entre iniciadores. La PCR ha permitido el desarrollo de marcadores moleculares que han abierto nuevas perspectivas para resolver los problemas tradicionales de caracterización (Karp *et al.*, 1997; Henry, 1998).

Existen ventajas en el uso de la PCR para la determinación de genotipos a partir de una muestra de DNA; el ensayo toma sólo unas cuantas horas comparado con la transferencia "Southern" blotting requerida con los RFLP's, donde se requieren días o hasta semanas. Otras ventajas de la PCR es que se pueden procesar simultáneamente un gran número de muestras; se utiliza una mínima cantidad de DNA, desde 10 hasta 100 ng (Rafalski y Tinguey, 1993), mientras que en la transferencia "Southern" se requieren de 5 a 10 microgramos (Erich y Arnheim, 1992).

2.10.3.2 Secuencias Simples Repetidas o Microsatélites (SSR).

Los microsatélites o SSR (por sus siglas en inglés: Simple sequence repeats) son marcadores conformados por secuencias específicas cortas de oligonucleótidos con longitud de 1 a 6 pares de bases (Albani y Wilkinson, 1998; Weising *et al.*, 2005) que se encuentran dispersos en el genoma de todos los eucariontes (Fugang *et al.*, 2003). Cuando estas regiones son individualmente amplificadas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizan un par de iniciadores específicos (de 20 a 30 bases) complementarios a las secuencias que flanquean el microsatélite, muestran casi invariablemente polimorfismo debido a las diferencias en su longitud, como consecuencia de la ocurrencia de los diferentes números de las unidades de repetición dentro del microsatélite, resultando en numerosas variantes alélicas (Jones *et al.*, 2007). El origen de tal polimorfismo puede ser que se deba al evento de "resbalón" o slippage durante la replicación del DNA (Ferreira y Grattapaglia, 1998), en el cual ya sea la cadena nueva o la cadena patrón se desliza sobre la otra en al

menos una unidad repetida, resultando en un mal apareamiento de las mismas (Smith *et al.*, 1997; Ferreira y Grattapaglia, 1998). Otras posibles causas para la generación de polimorfismo pueden ser las mutaciones como las deleciones e inserciones, ya sean en el microsatélite en sí o en las regiones que lo flanquean alterando el tamaño de la región de éste (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Los microsatélites fueron inicialmente descritos en humanos, y en poco tiempo fueron hallados en otros mamíferos como el ratón y el cerdo. Su potencial como marcadores útiles para los estudios en plantas fue rápidamente reconocido, resultando en su aislamiento y aplicación en muchas especies (Saunders *et al.*, 2002). Es así, que los principales cultivos en la actualidad cuentan con una base de datos con apreciable cantidad de microsatélites, los cuales han sido utilizados para medir diversidad genética en maíz (Bantte y Prasanna, 2003; Hrvoje *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2007), olivo (LaRosa *et al.*, 2003), soya (Zou *et al.*, 2004), arroz (Fugang *et al.*, 2003), trigo (Somers *et al.*, 2004), cebada (Macaulay *et al.*, 2001), vid (Riaz *et al.*, 2004) y quelite (Maughan, 2004), sólo para citar algunos ejemplos.

La razón principal del incremento del uso de los SSRs como una herramienta molecular, es que proveen el más alto contenido de información polimórfica o PIC (Polymorphic Information Content) en comparación con otras técnicas como RFLP y RAPD (Becerra y Paredes, 2000). Poseen, además, otras ventajas que incluyen:

- ser altamente informativos: presentan herencia codominante y muchos alelos son encontrados entre individuos estrechamente relacionados.

- la presencia de "bandas tartamudas", las cuales se encuentran frecuentemente asociadas con la amplificación de DNA repetitivo como es el caso los microsatélites. Las "bandas tartamudas" son productos de la amplificación por PCR que difieren en una unidad de repetición con respecto a la longitud del alelo original. La ocurrencia de estas bandas dificulta la lectura de los geles, e inclusive, repetidamente son confundidos como alelos, complicando el análisis genotípico.

Estas limitaciones no han desalentado a muchos investigadores quienes han convertido a los microsatélites en una herramienta molecular muy utilizada. (Saunders *et al.*, 2002). Una vez que las secuencias de los iniciadores son diseñadas y publicadas, el análisis de los loci microsatélites es práctico para cualquier laboratorio que tenga las condiciones de realizar las técnicas de PCR y electroforesis. El desarrollo inicial de los microsatélites puede ser simplificado utilizando técnicas más avanzadas como el uso de librerías enriquecidas para una o más unidades repetidas (Fugang *et al.*, 2003). En la actualidad se han realizado gran cantidad de trabajos aplicando las ventajas de los microsatélites aún antes de ser establecida la correlación entre uno o más SSR y los loci que controlan características de interés agronómico. La disponibilidad de un grupo de microsatélites por si solo, ya permite emprender inmediatamente una serie de estudios importantes para los programas de mejoramiento genético. Así se tiene que las aplicaciones de los microsatélites pueden ser empleados en estudios de diversidad y distancia genética entre individuos de una misma especie o entre especies e inclusive entre géneros, también se aplican en estudios taxonómicos y análisis

filogenéticos y, más recientemente en la identificación y protección de variedades patentadas (Weising *et al.*, 2005). Se han desarrollado y usado para la elaboración de mapas genómicos y etiquetado de DNA en diferentes especies de plantas (Fugang *et al.*, 2003). El análisis molecular usando microsatélites es particularmente útil dada su habilidad para determinar heterocigocidad de las muestras y porque permite un fácil análisis y conteo de datos de un gran número de muestras (Saunders *et al.*, 2002).

Según Weising *et al.* (2005), las funciones potenciales de los microsatélites en genomas de eucariontes son tres: 1) las secuencias repetidas son elementos estructurales en ambos telómeros y centrómeros, 2) algunos microsatélites pueden servir como “pista de aterrizaje” para los factores de transcripción que aumentan o reducen la expresión de genes cercanos o vecinos, y 3) algunos microsatélites (especialmente repeticiones de trinucleótidos) son transcritos para codificar regiones de aminoácidos, por ejemplo repeticiones de CAG son traducidas dentro de repeticiones que codifican la proteína llamada glutamina, la cual es componente de la secuencia integral de varios factores de transcripción.

2.11 Caracterización morfológica vs caracterización molecular.

Los procedimientos tradicionales que comúnmente son utilizados en la caracterización de plantas superiores de interés económico son agronómicos o morfológicos. La caracterización agronómica o morfológica del maíz se basa principalmente en la estructura fenotípica de la planta que muestre características deseables al interés humano. Este tipo de caracterización es

por medio de métodos que son laboriosos, con un alto consumo de tiempo y propensos a errores si no se tiene la debida experiencia y cuidado; pero actualmente se están utilizando técnicas de identificación molecular en complemento a la caracterización agronómica (Bridge y Arora, 1998; Alves *et al.*, 2002).

En la actualidad existen variadas investigaciones sobre la caracterización genética en maíz en donde se han empleado diversas herramientas de análisis molecular (Lu y Bernardo, 2001; Moeller y Schaal, 1999; Waburton *et al.*, 2002). Una de estas herramientas está basada en el empleo de marcadores moleculares, que son utilizados de manera complementaria a la caracterización realizada con datos morfológicos (Rajora y Rahman, 2002). La aplicación de marcadores moleculares permite clarificar las relaciones genéticas de los grupos de organismos, principalmente cuando los criterios morfológicos o agronómicos de caracterización son variables. El uso de marcadores moleculares permite la identificación de organismos de forma viable y con mayor certeza por estar basado en la composición del DNA (Martin *et al.*, 2000; Valadez y Kahl, 2005).

La aparición en las últimas décadas de las técnicas moleculares y el desarrollo de los métodos para caracterización, identificación y de reconstrucción filogenética (tanto en sus aspectos teóricos como computacionales), ha creado una situación donde la controversia de “cual es el mejor tipo de marcador” puede ser analizada en profundidad y desde distintos ángulos; por lo que se debe revisar la controversia entre la “morfología” y las

“moléculas”, y para ello es necesario examinar las ventajas que se adjudican uno y otro análisis (Crisci y Morrone, 1995).

Una de las ventajas de los caracteres morfológicos es que se pueden tomar a partir de ejemplares conservados, y cierta información molecular podría ser obtenida a partir de ejemplares de colecciones; pero, la mayor parte de las técnicas moleculares (por el momento) requieren material fresco o crioconservado (Crisci y Morrone, 1995).

Los marcadores morfológicos se han usado en programas de mejoramiento para obtener variedades mejoradas de diversos cultivos; sin embargo, su desventaja es su tendencia a ocasionar grandes efectos fenotípicos, ya que normalmente el marcador se encuentra ligado no sólo a las características de interés sino también a otras características indeseables (Tanksley *et al.*, 1989). La clasificación basada en rasgos morfológicos no forma un criterio de confianza, por que éstos están limitados por efectos ambientales y fenotípicos; por lo que usar solo rasgos morfológicos, puede ser difícil el distinguir entre muchos cultivares (Fang y Roose, 1997).

Un punto importante y no siempre considerado, es el tema del muestreo. Utilizando caracteres morfológicos se revisan cientos y hasta miles de ejemplares, mientras que un estudio molecular se restringe a unos pocos (Castillo, 1996).

Los marcadores moleculares reflejan, además, un amplio espectro de niveles filogenéticos que van de acuerdo con la molécula analizada, desde relaciones interpoblacionales (e. g., ADN mitocondrial) hasta relaciones entre grandes grupos (e. g., ADN ribosómico). Este espectro no siempre se obtiene

con los caracteres morfológicos. Por último, la plasticidad fenotípica y otros procesos de variación no heredable que afectan principalmente a los caracteres morfológicos no afectan mayormente a los caracteres moleculares (Crisci y Morrone, 1995).

Según Castillo (1996), las principales ventajas de los marcadores moleculares, respecto a los caracteres morfológicos, son:

1. No están influenciados por el ambiente.
2. Puede usarse cualquier parte de la planta.
3. Requiere pequeñas partes de tejido vegetal.
4. El DNA es muy estable en condiciones de un refrigerador.
5. Pueden obtenerse y registrarse un ilimitado número de datos.

Sin embargo, este autor señala algunas desventajas de su uso:

1. Generalmente se caracteriza una pequeña parte del genoma y no necesariamente están ligados a caracteres morfológicos.
2. Muchos de ellos son costosos y requieren equipos especiales.

Una revisión de los estudios comparativos entre los resultados moleculares y morfológicos de diversos grupos, muestra en la mayoría de los casos una congruencia parcial entre los distintos tipos de marcadores, lo que obliga al investigador a preguntarse ¿qué se debe esperar? Los caracteres heredables de un organismo, ya sean moleculares o morfológicos, son el producto de una misma historia evolutiva, por lo que cuando se les analiza con los métodos apropiados debería esperarse que condujeran al mismo dendograma; es decir, a la misma interpretación biológica (Sytsma, 1990); pero ¿qué causa la incongruencia? Una posible causa de la incongruencia entre los resultados

moleculares y morfológicos es la existencia de errores metodológicos en la obtención y el análisis de los datos (muestreos, determinación de homologías, algoritmos de construcción de los árboles, dendogramas y selección del tipo de molécula) (Crisci, 1998); pero también, la inadecuada ubicación taxonómica de los genotipos o poblaciones en estudio puede conducir a una discrepancia en la interpretación (Luna, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material genético.

El material genético evaluado fueron 173 variedades nativas de maíz azul colectadas en diversas regiones de los Valles Altos Centrales de México y dos híbridos intervarietales que sirvieron como testigo. 155 colecciones y los híbridos testigos fueron donados por el Programa de Mejoramiento Genético que está a cargo del Dr. José de Jesús López Reynoso, Profesor Investigador del Departamento de Fitotecnia de la UACH, las cuales están resguardadas en el Banco de Germoplasma ubicado en el Departamento de Fitotecnia de la UACH, y 18 fueron donadas por la Dra. Yolanda Salinas Moreno, Investigadora del Campo Experimental del Valle de México (CEVAMEX) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Pecuarias (INIFAP) (Cuadro 1A).

3.2 Caracterización agronómica.

3.2.1 Localización del sitio experimental.

La fase de campo se realizó en el Campo Agrícola Experimental del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, en Chapingo, México, ubicado a una altitud de 2250 msnm, 19° 19' latitud norte, 98° 53' longitud oeste. Con una temperatura media anual de 15.2 °C, y una

precipitación media anual de 636.5 mm, siendo los meses más lluviosos de junio a septiembre (García, 1988).

El clima del lugar de acuerdo con la clasificación de Köppen modificada por García (1988) se define como C(Wo)(w)b(i')g, donde:

C(Wo) = Templado subhúmedo con lluvias en verano, el clima más seco de los subhúmedos, w = lluvia invernal menor del 5% del total anual; b = verano fresco, largo, temperatura media anual entre 12 a 18 °C; i' = poca oscilación anual (entre 5 a 10 °C de las temperaturas medias anuales); g = el mes más caliente se sitúa antes del solsticio de verano.

3.2.2 Unidad experimental.

La unidad experimental consistió de un surco de 5 m de largo conteniendo un total de 26 plantas separadas a una distancia de 20 cm, lo que dio una densidad de población de 62 500 plantas ha⁻¹.

3.2.3 Diseño experimental.

Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con un total de 175 tratamientos con tres repeticiones por tratamiento, produciendo un total de 525 unidades experimentales.

3.2.4 Variables agronómicas evaluadas.

Para la caracterización agronómica, las variables que se cuantificaron fueron:

Número de plantas por parcela (NPP). Número de plantas totales por parcela a la cosecha.

Días a floración masculina (DFM). Número de días transcurridos desde la siembra hasta que el 50% de las plantas de cada parcela se encontraban en antesís (cuando la mitad de las plantas de la parcela tenían espigas liberando polen).

Días a floración femenina (DFF). Número de días desde la siembra hasta que el 50% de las plantas de cada parcela presentaban jilotes con estigmas expuestos de aproximadamente 2 cm de longitud.

Altura de planta (AP). Altura promedio (en cm) tomada desde la superficie del suelo hasta la lígula de la hoja bandera (última hoja superior), en una muestra por parcela de 10 plantas con competencia completa tomadas al azar.

Altura de mazorca (AM). Altura promedio (en cm) tomada desde la superficie del suelo hasta el nudo de inserción de la mazorca superior (principal). Esta variable se evaluó en las mismas plantas seleccionadas para estimar AP.

Mazorcas por planta (MPP). Cociente del número de mazorcas cosechadas sobre el número total de plantas por parcela.

Longitud de mazorca (LM). Longitud (en cm) de la base hasta la punta de la mazorca, estimada como promedio de cinco mazorcas.

Diámetro de mazorca (DMM). Diámetro (en cm) de la parte media de la mazorca en las mismas mazorcas utilizadas para la estimación de LM.

Número de hileras por mazorca (NHM). Se contabilizó el número de hileras en la parte media de cinco mazorcas y se registró el promedio.

Número de granos por hilera (NGH). Se cuantificó el promedio del número de granos por hilera en cinco mazorcas muestreadas por parcela.

Porcentaje de grano (PG). Se obtuvo desgranando cinco mazorcas por parcela, estabilizando la humedad a temperatura ambiente y calculando la relación entre el peso total del grano con respecto al peso total de mazorca y se multiplicó por 100.

Peso de campo (PDC). Peso total (en kg) de todas las mazorcas cosechadas por parcela.

Rendimiento por planta (RPP). Se calculó dividiendo el peso de campo (PDC) entre el número de plantas por parcela (NPP).

Peso de 200 granos (PS). Se tomaron 200 granos de una muestra obtenida al desgranar cinco mazorcas y se determinó su peso en gramos.

Diámetro del olote (DOL). Se midió (en cm) la parte central de cinco olotes mediante un vernier y se registró el promedio.

3.2.5 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$), adicionalmente se calcularon las correlaciones entre variables, así como análisis multivariados para establecer los patrones de semejanza o diversidad existentes entre las variedades nativas de maíz azul. El análisis multivariado consistió en la aplicación de las técnicas de conglomerados y discriminante canónico. El análisis de agrupamiento se utilizó para la generación de grupos de las variedades, el cual se realizó con el método de Ward que calcula la varianza entre grupos y las minimiza. El análisis discriminante canónico se aplicó para la corroboración de la agrupación y determinación de variables responsables de

ésta (Johnson, 2000). Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System, versión 8.0) (SAS Institute Inc., 1999).

3.2.6 Manejo agronómico del experimento.

La siembra se realizó el día 26 de mayo del 2006, en forma manual con la ayuda de un pala recta, depositando 2 semillas por golpe a una distancia de 20 cm entre plantas. A los 30 días se aclaró dejando una planta por sitio. La formula de fertilización empleada fue 140-70-70. La fuente utilizada del nitrógeno fue urea y del fósforo fue superfosfato de calcio triple. Se aplicó un tercio del nitrógeno y todo el fósforo al momento de la siembra y el resto del nitrógeno fue aplicado al momento del aporque (30 días después de la siembra). Se realizaron dos riegos de auxilio previos al establecimiento del temporal. El primero se aplicó inmediatamente después de la siembra, el segundo a los 15 días. La cosecha fue manual y se efectuó a mediados del mes de noviembre.

3.3 Caracterización molecular.

La fase de caracterización molecular se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.3.1 Obtención del material vegetal.

Se sembraron 20 semillas de cada una de las variedades nativas en charolas de germinación y se mantuvieron bajo condiciones de invernadero, únicamente proporcionándoles agua. A partir de la fecha de emergencia se dejaron crecer las plántulas durante 28 días (cuando tuvieron seis hojas) y se procedió a cortar las hojas jóvenes sin áreas necróticas ni lesiones, colocándolas en bolsas de papel y almacenándolas en un congelador a una temperatura de -20 °C, hasta que fueron liofilizadas.

3.3.2 Liofilización de las muestras.

La liofilización se realizó durante 72 horas, a una presión de vacío de 26 mBar y una temperatura de -45 °C en una liofilizadora marca Labconco Frazee Dry Sistem LYPH LOCK 4.5 (Figura 1). Posteriormente, cada muestra formada por el tejido de 20 plantas, se molieron en un molino de café marca Krups, hasta obtener un polvo muy fino (Figura 2) y en seguida se guardaron en tubos Eppendorf de 2 mL, previamente etiquetados, y se mantuvieron en congelación (-20 °C) hasta su uso para la extracción del DNA.

3.3.3 Extracción del DNA.

Se utilizaron 50 mg de tejido liofilizado de cada una de las muestras en una balanza analítica marca Kern ABS. La extracción de DNA se realizó de manera mecánica con un equipo automatizado modelo "Maxwell 16 System for Genomic DNA Purification" marca Promega (Figura 3). El equipo extrae el DNA con la ayuda de kits compuestos por cartuchos (marca Promega). Se utilizaron kits

(marca Promega) uno por muestra, consistentes en 48 cartuchos, por lo que se emplearon 175 cartuchos en total. El cartucho consiste de siete celdas, en donde cada una contiene un tipo de solución amortiguadora para extracción de DNA (Figura 4). En la primera celda se colocó la muestra de tejido liofilizado, y en la séptima celda se puso un “bastón” magnetizado que ayudó a la maceración del tejido para facilitar la extracción (Figura 5). Cada cartucho fue colocado en el aparato sobre una base la cual está acondicionada para fijarlos (Figura 6) y en la misma se puso un tubo de plástico al que previamente se le había agregado un amortiguador de elusión, en donde se recuperó el DNA (Figura 7). Mediante movimientos mecanizados y con la ayuda del “bastón” magnetizado, la muestra del tejido fue pasando por cada una de las celdas hasta llegar a la séptima; y finalmente el DNA fue diluido en el tubo de plástico en donde quedó listo el DNA ya extraído y disuelto en el amortiguador de elusión. A continuación se procedió a transferir la solución a un tubo Eppendorf de 0.5 mL para ser analizado (Figura 8). En el aparato se emplearon 16 cartuchos a la vez, y el tiempo requerido para la extracción del DNA fue de 45 minutos por cada carga.

3.3.4 Cuantificación del DNA.

A partir de la solución de DNA obtenida a partir de cada muestra se cuantificó la concentración y pureza del DNA por medio de un espectrofotómetro ND-1000 UV/Vis, marca Nanodrop (Figura 9).

La pureza del DNA se evaluó como la proporción de las lecturas a longitudes de onda de 260 a 280 nm (260/280), donde valores entre 1.8 y 2.0

indicaron DNA con pureza suficiente para la reacción de PCR; mientras que una relación inferior a 1.8 indicó la existencia de proteínas y/u otros elementos absorbentes de UV en la muestra. Valores mayores de 2.0 sugieren contaminación por cloroformo, fenol o alguna otra sustancia orgánica (CIMMYT, 2006).

Una vez obtenida la lectura para cada muestra, éstas se usaron como solución stock para preparar las diluciones de trabajo para obtener una concentración uniforme de 20 ng μL^{-1} .



Figura 1. Aparato liofilizador marca Labconco Frazee Dry System LYPH LOCK 4.5.

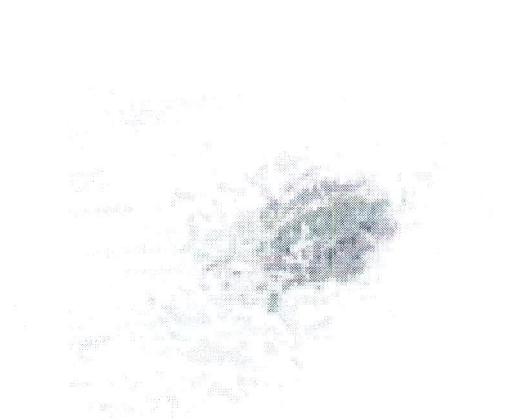


Figura 2. Tejido de hojas de maíz liofilizado y molido.



Figura 3. Aparato para la extracción de DNA, modelo "Maxwell 16 System for Genomic DNA Purification", marca PROMEGA.

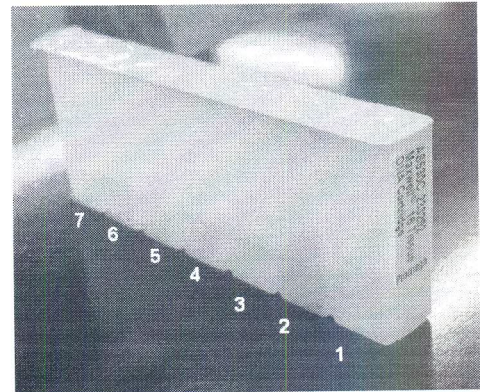


Figura 4. Cartucho Maxwell 16 DNA Purification. La figura muestra los contenidos del cartucho de cada una de una de las celdas. 1) Muestra de tejido + amortiguador de lisis, 2) "perlas" magnetizadas, 3) a 7) amortiguador de lavado.

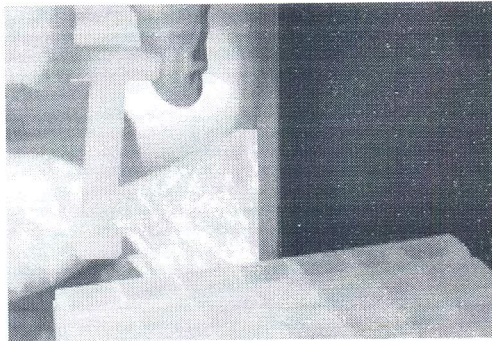


Figura 5. "Bastón" magnetizado para macerar el tejido para la extracción del DNA.

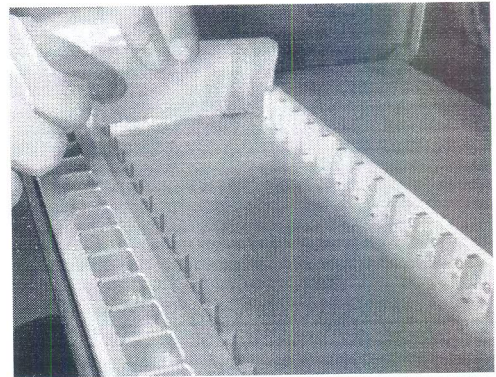


Figura 6. Colocación del cartucho en una base acondicionada del aparato "Maxwell 16 System for Genomic DNA Purification".



Figura 7. Tubo de plástico donde finalmente queda el DNA extraído.

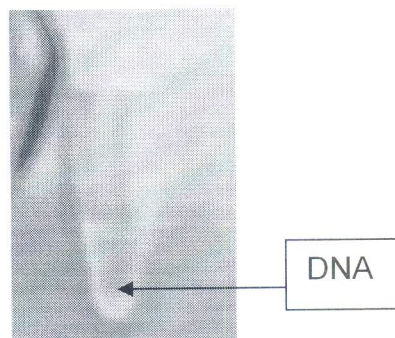


Figura 8. Tubo Eppendorf con el DNA extraído de una muestra de maíz azul.

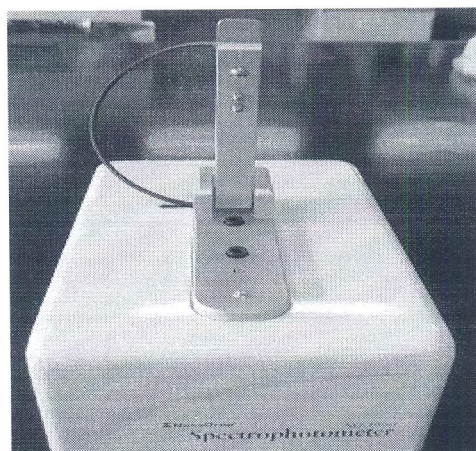


Figura 9. Espectrofotómetro modelo ND-1000 UV/Vis, marca Nanodrop.

3.3.5 Determinación de la calidad del DNA.

Se realizó un gel de calidad para estimar la posible degradación o fragmentación del ADN durante el proceso de extracción. Para ello se preparó un gel de agarosa al 1.2 % disuelta en TAE 1X y una cámara de electroforesis horizontal de 12 x 24 cm Modelo SUNRISE TM96 de Life Technologies (Figura 10). En cada pozo se colocaron 5 μ L de DNA y 2 μ L de colorante de carga

(GIBCO BRL). La electroforesis se realizó a 120 volts durante una hora. Finalizado el corrimiento de las muestras se procedió al revelado del gel con bromuro de etidio durante 8 minutos y se lavó con agua destilada estéril durante 10 minutos; posteriormente la calidad del DNA se visualizó con el programa Kodak Digital Science ID 2.03.

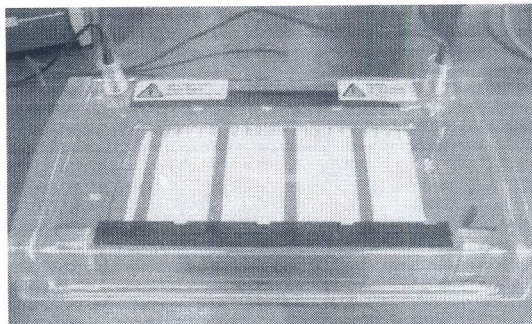


Figura 10. Cámara horizontal para electroforesis modelo SUNRISE™96 de Life Technologies.

3.3.6 Selección de iniciadores SSR.

Se utilizó la técnica molecular de microsatélites (SSR) para detectar el nivel de polimorfismo existente entre todos los genotipos evaluados agronómicamente, con la finalidad de generar información que permitiera hacer una discriminación precisa entre individuos altamente emparentados en las variedades nativas consideradas en el trabajo.

Se utilizaron 10 pares de iniciadores sintetizados por Genosys en las 173 poblaciones nativas de maíz azul y los 2 testigos. Los iniciadores se seleccionaron porque en trabajos anteriores fueron los que produjeron mejor amplificación con mayor definición y reproducibilidad (Santacruz, 2001). Su secuencia se corroboró en el Maize Data Bank (<http://www.agron.missouri.edu/Coop/SSR-Probes/SSR1.html>) (Cuadro 1).

3.3.7 Establecimiento de la reacción de PCR para la técnica de SSR.

Las condiciones de reacción para la PCR con la técnica de SSR se realizaron de tal manera que algunos de los iniciadores fueron organizados en grupos para la amplificación simultánea de varios *loci*, a fin de hacer más eficiente el proceso (Cuadro 1) de acuerdo con Santacruz (2001). La amplificación se realizó en un volumen final de 25 μ L más una gota de aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra con los cambios de temperatura durante el ciclaje. En los Cuadros 2, 3 y 4, se muestran las mezclas de reacción utilizadas para los grupos con 4,2 y 1 iniciador, respectivamente.

3.3.8 Condiciones de termociclaje para la técnica SSR.

Para la amplificación mediante la PCR se usó un termociclador Applied Biosystems modelo 2720. El programa de termociclaje para la técnica de SSR fue variable para cada grupo de amplificación (Cuadro 1). Para los grupos 1 y 2 consistió en una desnaturalización inicial de 4 minutos a 95 °C, seguida de 25 ciclos con una etapa de desnaturalización de 1 minuto a 95 °C, una de alineamiento durante 2 minutos a 55 °C, una extensión de 2 minutos a 72 °C, y una etapa final de 1 hora para extensión adicional a 72 °C. La amplificación de los iniciadores de los grupos 3 y 4 fue de una desnaturalización inicial a 95 °C durante 4 minutos, seguida por 40 ciclos en donde se consideró una etapa de desnaturalización a 95 °C de 1 minuto, una de alineamiento a 66 °C por 50 segundos y otra de extensión a 72 °C durante 50 segundos. Al final del programa se incluyó un último ciclo de extensión final a 72 °C de 10 minutos.

Cuadro 1. Iniciadores evaluados para la técnica SSR.

Grupo de amplificación	Locus	Unidad repetitiva	Tamaño de fragmento (pb)	Iniciadores Forward y Reverse
1	phi051	AGC	136-154	GCGAAAGCGAACGACAACAATCTT ACATCGTCAGATTATATTGCAGACCA
	phi115	ATAC	292-312	GCTCCGTGTTTCGCCTGAA ACCATCACCTGAATCCATCACA
	phi062	GAC	158-178	CCAACCCGCTAGGCTACTTCAA ATGCCATGCGTTCGCTCTGTATC
	phi033	CCT	224-270	ATCGAAATGCAGGCGATGGTTCTC ATCGAGATGTTCTACGCCCTGAAGT
2	phi093	CTAG	272-296	GTGCGTCAGCTTCATCGCCTACAAG CCATGCATGCTTGCAACAATGGATACA
	phi085	GCGTT	233-266	AGCAGAACGGCAAGGGCTACT TTTGGCACACCACGACGA
3	phi96342	ATCC	223-256	GTAATCCCACGTCCTATCAGCC TCCAACCTGAACGAACCTCCTC
4	phi448880	AAG	174-191	CGATCCGGAGGAGTTCCTTA CCATGAACATGCCAATGC
5	phi121	CCG	93-105	AGGAAAATGGAGCCGGTGAACCA TTGGTCTGGACCAAGCACATACAC
6	phi159819	CCG	119-139	GATGGGCCCTAGACCAGCTT GCCTCTCCCATCTCTCGGT

Cuadro 2. Mezcla de reacción utilizada en PCR para la técnica de SSR en el grupo de amplificación de 4 iniciadores.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen
Agua HPLC			5.8 μL
Buffer	5X	1X	5.0 μL
MgCl ₂	25 mM	2.0 mM	1.5 μL
dNTP's	2.5 mM	0.2 mM	2.0 μL
Taq DNA Polimerasa	5 U μL^{-1}	0.04 U μL^{-1}	0.2 μL
Iniciadores	10 pmol μL^{-1}	0.8 pmol μL^{-1}	8.0 μL
DNA	20.0 ng μL^{-1}	2.0 ng μL^{-1}	2.5 μL

Cuadro 3. Mezcla de reacción utilizada en PCR para la técnica de SSR en el grupo de amplificación de 2 iniciadores.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen
Agua HPLC			9.8 μL
Buffer	5X	1X	5.0 μL
MgCl ₂	25 mM	2.0 mM	1.5 μL
dNTP's	2.5 mM	0.2 mM	2.0 μL
Taq DNA Polimerasa	5 U μL^{-1}	0.04 U μL^{-1}	0.2 μL
Iniciadores	10 pmol μL^{-1}	0.8 pmol μL^{-1}	4.0 μL
DNA	20.0 ng μL^{-1}	2.0 ng μL^{-1}	2.5 μL

Cuadro 4. Mezcla de reacción utilizada en PCR para la técnica de SSR en los grupos de amplificación de 1 iniciador.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen
Agua HPLC			11.8 μL
Buffer	5X	1X	5.0 μL
MgCl ₂	25 mM	2.0 mM	1.5 μL
dNTP's	2.5 mM	0.2 mM	2.0 μL
Taq DNA Polimerasa	5 U μL^{-1}	0.04 U μL^{-1}	0.2 μL
Iniciadores	10 pmol μL^{-1}	0.8 pmol μL^{-1}	2.0 μL
DNA	20.0 ng μL^{-1}	2.0 ng μL^{-1}	2.5 μL

Para los iniciadores de los grupos de amplificación 5 y 6, el termociclaje que se siguió fue de una desnaturalización inicial a 95 °C durante 4 minutos, seguida por 40 ciclos en donde se consideró una etapa de desnaturalización a 95 °C (1 minuto), otra de alineamiento a 66 °C (50 segundos) y otra de extensión a 72 °C por 50 segundos. Al final del programa se incluyó un último ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

Posteriormente, los productos de reacción de los grupos de amplificación 3, 4 y 5 se mezclaron entre sí y se separaron simultáneamente con electroforesis en geles de poliacrilamida.

3.3.9 Electroforesis de los productos amplificados.

Para la técnica SSR, la separación de los fragmentos obtenidos se hizo por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% que se utiliza principalmente para separar fragmentos de DNA de bajo peso molecular (50 a 1000 pb), como son los productos de reacciones de amplificación o productos de digestión con

enzimas de restricción que requieren mayor definición. Los geles de poliacrilamida se prepararon a partir de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida, amortiguador TBE 10X, TEMED y persulfato de amonio (APS) (Cuadro 5). La proporción de las dos primeras sustancias influye en el tamaño del poro, el persulfato de amonio y el TEMED inician la polimerización (Valadez y Kahl, 2005). Los productos de reacción se mezclaron con 6 μ L de amortiguador de carga (GIBCO BRL), y en cada pozo se cargaron 5 μ L de la mezcla. Se utilizó un marcador de peso molecular de 50 pb (PROMEGA), únicamente para el grupo de amplificación 6 se usó un marcador de peso de 100 pb (FERMENTAS). Los marcadores se cargaron en los extremos del gel colocando 2.5 μ L en cada pozo. La electroforesis se hizo en una cámara vertical modelo MVG-216-33 de Scientific Co. (Figura 11), que se llenó con amortiguador TBE 1X. Se aplicó una corriente eléctrica de 250 volts durante 2 horas y 30 minutos, tiempo suficiente para la separación adecuada de los fragmentos. Para la tinción del DNA, los geles se sumergieron en una solución de 500 mL de ácido acético glacial 10% durante 20 minutos, después se pasaron a otra solución de 250 mL de nitrato de plata 0.1 % por 10 minutos, y luego a otra solución de 500 mL de hidróxido de sodio 3 % con 1000 μ L de formaldehído durante 30 minutos. Al término de este tiempo, se lavaron con agua corriente y se observaron en el transiluminador de luz blanca.

Cuadro 5. Mezcla utilizada para la preparación de geles de poliacrilamida para preparar una placa.

Reactivo	Concentración	Volumen
Acrilamida y bisacrilamida en una relación 29:1	40%	11 mL
TBE	10X	5.5 mL
Agua destilada estéril		38.5 mL
TEMED	100%	33.0 μ L
Persulfato de amonio	25%	220.0 μ L

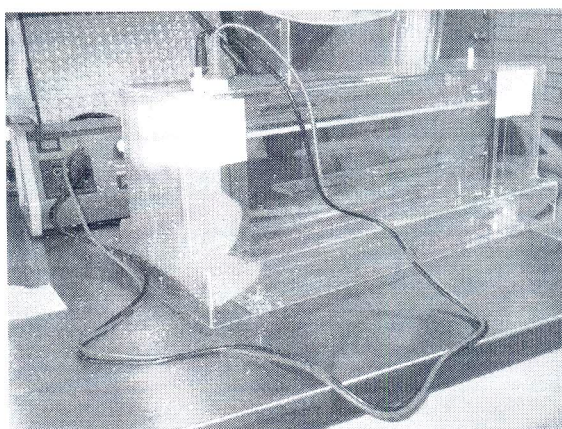


Figura 11. Cámara vertical para electroforesis modelo MVG-216-33 de Scientific Co.

3.3.10 Codificación de datos y análisis estadístico.

La documentación de los productos amplificados se realizó por fotografía instantánea, usando una cámara digital marca Canon. Las bandas reveladas para cada muestra y por cada iniciador de SSR se analizaron con el programa Kodak Digital Science ID 2.03, el cual calculó el tamaño del fragmento en pb correspondiente a cada banda detectada, auxiliándose de los marcadores de peso que bordearon a los geles; de esta manera se determinaron las bandas monomórficas y polimórficas. Conociendo el núcleo (la unidad repetitiva) de

cada microsatélite, se determinaron las bandas de mayor y menor longitud en pb, y se establecieron rangos con base en el núcleo de los microsatélites, de tal manera que todos los fragmentos cuyo tamaño estaba dentro de un rango determinado se codificaban con el dígito 1, y los que no entraban en ese rango se codificaban con el dígito 0, y así elaborar la matriz binaria.

Con la matriz binaria obtenida de los datos de SSR se hizo el análisis correspondiente mediante el uso del paquete computacional Sistema de Análisis Multivariado y Taxonomía Numérica (NTSYS) versión 2.02, con el que se realizaron los cálculos de distancias genéticas entre los genotipos. El índice de similitud fue calculado usando el coeficiente de Jaccard, luego se construyeron los dendogramas por el método de análisis de conglomerados de agrupación jerárquica (SAHN), usando el método de agrupamiento promedio de medias aritméticas no ponderadas (UPGMA) (Rohlf, 1993).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización Agronómica.

4.1 Análisis de varianza.

En el Cuadro 6 se muestran los cuadrados medios del error del análisis de varianza para las variables evaluadas en las variedades nativas de maíz azul, en el cual se observan diferencias altamente significativas ($\alpha \leq 0.01$) en la mayoría de las variables consideradas, excepto para altura de planta, mazorcas por planta y rendimiento por planta que fueron significativas con una $\alpha \leq 0.05$. Lo anterior indica que al menos una de las variedades fue estadísticamente diferente a las demás.

Los coeficientes de variación (CV) fueron bajos en la mayoría de las variables, excepto en mazorcas por planta (MPP), peso de campo (PDC) y rendimiento por planta (RPP). Los CV del 37 o 45% son valores que indicaron que los resultados obtenidos no son confiables para éstas variables, las cuales son complejas y fueron altamente afectadas por las condiciones ambientales presentes en el sitio de evaluación y por la variabilidad genética de las variedades nativas que fueron de diferente origen geográfico (López *et al.*, 2004).

Cuadro 6. Cuadrados medios de tratamientos y del error del análisis de varianza, coeficientes de variación y media de las variables registradas.

VARIABLE	gl	CM	CME	CV	MEDIA
Número de plantas por parcela	312	16.48	9.04**	24.00	12.53
Días a floración masculina	312	153.50	25.45**	5.72	88.09
Días a floración femenina	312	108.78	1.75**	1.46	90.63
Altura de planta	312	409.02	308.54*	7.60	231.06
Altura de mazorca	312	527.37	313.10**	12.78	138.38
Mazorcas por planta	312	0.16	0.11*	37.09	0.92
Longitud de mazorca	312	4.45	0.77**	6.53	13.47
Diámetro de mazorca	312	0.14	0.03**	4.51	4.42
Número de hileras por mazorca	312	2.77	0.87**	6.57	14.24
Número de granos por hilera	312	23.49	4.43**	7.55	27.86
Porcentaje de grano	312	5.16	0.15**	0.47	84.41
Peso de campo	312	0.60	0.22**	37.54	1.25
Rendimiento por planta	312	3203.35	2204.41*	45.12	104.05
Peso de 200 granos	312	131.59	11.07**	5.79	57.39
Diámetro del olote	312	0.05	0.02**	8.52	2.02

** Significancia con $\alpha \leq 0.01$; *Significancia con $\alpha \leq 0.05$.

4.2 Comparación de medias.

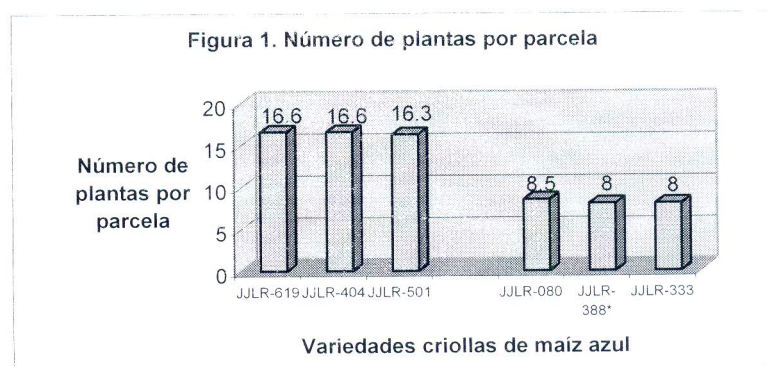
En el Cuadro 2A (Apéndice), se presentan las comparaciones de medias por la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$) de todas las variables consideradas para cada variedad nativa, y fue posible apreciar los materiales sobresalientes en cada variable evaluada. En el mismo Cuadro se puede valorar que las variedades sobresalientes fueron diferentes en cada variable, lo que indica la variación genética que tienen estas poblaciones nativas, así como su diferente

grado de adaptación y de respuesta a las condiciones ambientales del sitio de evaluación. A continuación se analiza cada una de las variables evaluadas en este estudio.

4.2.1 Número de plantas por parcela (NPP).

En el análisis de varianza se observaron diferencias altamente significativas en esta variable, sin embargo, dichas diferencias no fueron detectadas en el análisis de comparación de medias con la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). El número promedio de plantas por parcela fue de 12.5 (Cuadro 6), con un máximo de 16.6 plantas en las variedades JJLR-619 y JJLR-404 y un mínimo de 8 plantas en las variedades JJLR-388 y JJLR-333 (Cuadro 2A; Figura 12). Los testigos Az01xProbador y Az13xProbador mostraron un promedio de 13 y 12.6 plantas por parcela, estando ligeramente por arriba de la media general. Los resultados anteriores pueden debido a la mayor capacidad de adaptación de las variedades nativas a las condiciones ambientales que prevalecieron en el sitio en que crecieron, adaptación lograda según Luna (1992), porque estas plantas se originan de semillas que llevan la herencia de una buena capacidad de germinación, baja competencia intraespecífica y tolerancia a la escasez de humedad y altas temperaturas; ventajas que no pudieron expresar el resto de las variedades por estar adaptadas a otros ambientes específicos.

Figura 12. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor número de plantas por parcela.



4.2.2 Días a floración masculina (DFM) y femenina (DFF).

En las variedades nativas se encontraron diferencias altamente significativas ($\alpha \leq 0.01$) para estas variables, con promedio de 88.0 días a FM y de 90.6 días a FF en las variedades nativas (Cuadro 6). Los testigos presentaron 82.0 y 82.6 a DFM, respectivamente, así como 87.3 y 86.3 para DFF; sin embargo no mostraron diferencias estadísticas con las poblaciones nativas (Cuadro 2A). Para DFM las variedades nativas JJLR-427, JJLR-58, JJLR-717, JJLR-395, JJLR-416 y JJLR-732 fueron las más tardías, con un promedio de 111.5, 111.0, 109.3, 106.5, 106.5 y 106.5 días, respectivamente (Cuadro 2A y Figura 13). Para DFF las poblaciones más tardías fueron JJLR-416, JJLR-427, JJLR-395, JJLR-717, JJLR-126 con 109.0, 109.0, 108.0, 107.3 y 106.6 días, respectivamente (Cuadro 2A; Figura14).

Las variedades más precoces para DFM fueron JJLR-722, JJLR-027, JJLR-519, YSM-221, JJLR-651 y JJLR-024 todas con un promedio de 82.0 días; con respecto a DFF los materiales más precoces fueron JJLR-056, JJLR-027, JJLR-

641, JJLR-628, JJLR-503 y JJLR-704 con 85.3, 85.3, 85.0, 84.3, 84.3 y 83.0 días (Cuadro 2A; Figuras 13 y 14).

De acuerdo con los resultados obtenidos para DFM se observa una diferencia de 29.5 días entre la variedad más tardía (JJLR-427) y las más precoces. Para DFF la diferencia fue de 26.0 días entre la variedad más tardía (JJLR-416) y la más precoz (JJLR-704). Lo anterior se relaciona con lo afirmado por Arellano *et al.* (2003) y Miguel (2003), quienes mencionan que cuando las variedades criollas de maíz azul son cultivadas fuera de su área de origen y adaptación, registran mayor número de días a floración masculina y femenina, así como un mayor intervalo de floración, dando como resultado una esterilidad alta en las plantas, lo que repercute en el rendimiento de grano, debido a que bajo condiciones ambientales adversas la polinización se reduce por el efecto de las altas temperaturas ya que los estigmas expuestos a la recepción del polen son únicamente los de la base de la mazorca.

La mayoría de las poblaciones se comportaron como de ciclo intermedio a precoz, lo cual representa una ventaja desde el punto de vista del mejoramiento genético, ya que considerando factores impredecibles del ambiente que causan siniestros a los cultivos (como sequías y heladas), las variedades más precoces tienen mayor probabilidad de tener éxito en su crecimiento y desarrollo y llegar a producir una buena cosecha porque interaccionan menos tiempo con el ambiente (Brauer, 1980).

La población criolla más precoz (JJLR-027), presentó el menor número de mazorcas por planta (MPP) (0.63), menor peso de campo (PDC) (0.76 kg parcela⁻¹) y menor rendimiento por planta (RPP) (47.1 g planta⁻¹). Estos

tienden a ser menos sensibles al fotoperíodo, lo cual les permite completar su ciclo en un tiempo relativamente más corto bajo las condiciones de días largos que caracterizan a los veranos de las zonas templadas (Fischer *et al.*, 1987). La relación precocidad y menor rendimiento, también se pudo deber a que la temperatura, en el sitio de evaluación, tuvo una influencia directa sobre la eficiencia con la cual la radiación absorbida es utilizada, como lo mencionan Kiniry y Knievel (1995) que establecen que a temperaturas más elevadas, el maíz completa su ciclo vital en menos tiempo, por lo que la planta puede manifestar menor rendimiento.

Figura 13. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor número de días a floración masculina.

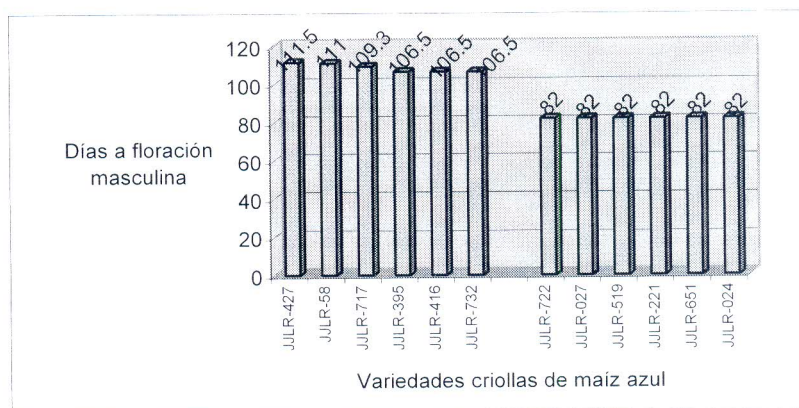
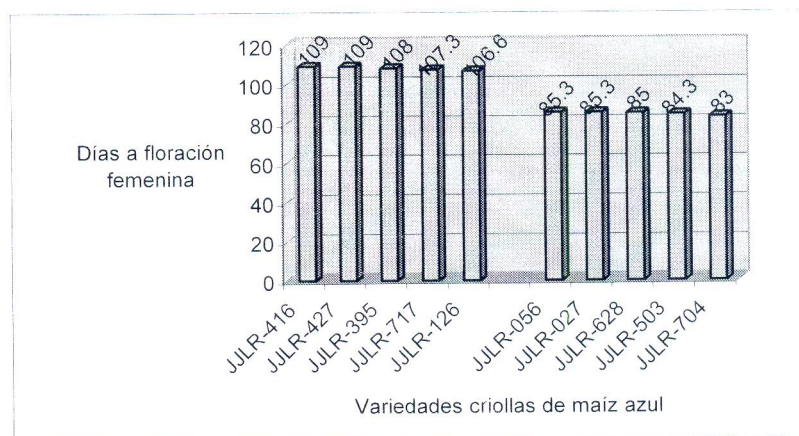


Figura 14. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor número de días a floración femenina.



4.2.3 Altura de planta (AP) y de mazorca (AM).

En el Cuadro 2A se presenta la comparación de medias para altura de planta (AP), donde se observaron diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$) para esta variable; la altura promedio fue de 231.06 cm, Las poblaciones que tuvieron las plantas más altas fueron la variedad JJLR-725 con una altura de 259.0 cm, seguida por las variedades JJLR-387 (255.3 cm), JJLR-654 (255.0 cm) y JJLR-717 (254.3 cm); mientras que las menores alturas fueron de 205.0, 204.3, 203.5, 202.5 y 180.0 cm en las poblaciones JJLR-598, JJLR-033, JJLR-321, JJLR-240 y JJLR-309, respectivamente (Cuadro 2A; Figura 15); característica que es favorable para reducir el daño por los vientos y reducir riesgos de acame de raíz y tallo. Estas variedades se encuentran dentro del rango de altura de planta recomendado de 190-210 cm para variedades mejoradas de maíz azul de polinización libre de la raza Chalqueño (Arellano, 2006).

La AP para los testigos fue de 224.6 y 225.0 cm, respectivamente (Cuadro 2A), valores que se mantuvieron por debajo de la media general que fue de

231.6 cm, la cual estuvo por arriba de lo recomendado para regiones de temporal (Arellano, 2006).

La mayor altura de planta encontrada para algunas variedades no representa una desventaja desde el punto de vista de los agricultores debido a que está asociada a un mayor número de hojas que se utilizan como forraje para la alimentación de los animales; otra ventaja que presentan estas variedades es el alto contenido de azúcares en el tallo que hace que sean más apetitosas para el ganado, disminuyendo así el desperdicio al momento de consumirlas.

Para altura de mazorca (AM), la comparación de medias indicó que hubo diferencias significativas para esta variable (Cuadro 6), donde la mayor altura de mazorca fue de 176.6 cm para la variedad JJLR-747, seguida por JJLR-029, JJLR-026, JJLR-273 y JJLR-732 con 173.3, 166.0, 165.5 y 165.0 cm, respectivamente, variedades que no presentaron mayor altura de planta. Las menores alturas de mazorca fueron para las poblaciones JJLR-309 con 102.5 cm, JJLR-392 con 105.0 cm, YSM-47 con 113.3 cm, JJLR-647 con 113.3 cm y JJLR-075 con 118.0 cm (Cuadro 2A y Figura 16). En este caso, la variedad de menor AM (JJLR-309) sí fue la de menor AP. La altura de mazorca promedio fue de 138.38 cm, mientras que para los testigos fue de 127.6 y 119.6 cm, respectivamente, que los ubica por debajo de la media general de 138.3 cm; no obstante, no hubo diferencias significativas con respecto a la variedad nativa de mayor altura de mazorca.

La reducción de altura de mazorca es una característica importante de tomar en cuenta en las variedades criollas, Antuna *et al.* (2003) y Gutiérrez *et*

al. (2004) mencionan que es recomendable tener plantas de maíz con menor altura de mazorca, ya que pueden tolerar altas densidades de población y ser más resistentes al acame, lo cuál indica que la reducción de este carácter puede influir en una relación positiva con el rendimiento de grano. Por otra parte, Luna y Gutiérrez (2000) señalan que las variedades con altura de mazorca intermedia o baja son las más adecuadas para la cosecha manual o mecanizada, debido a que esta labor es más eficiente si la variedad sembrada no está acamada, situación que se evitaría manejando plantas con mazorca de porte bajo.

Figura 15. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor altura de planta.

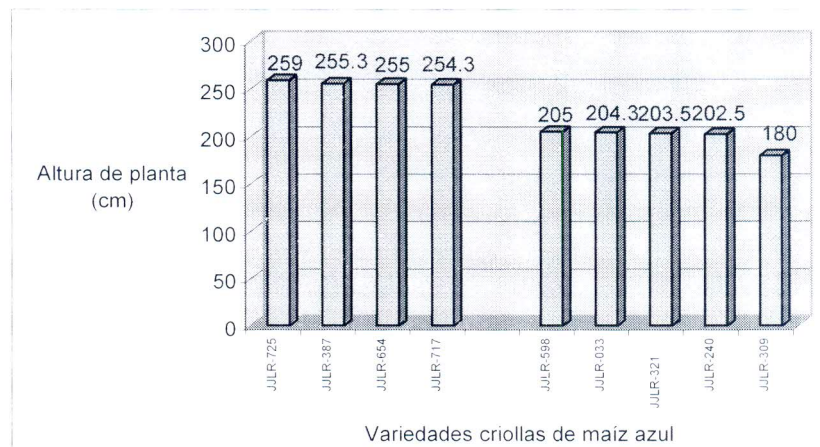
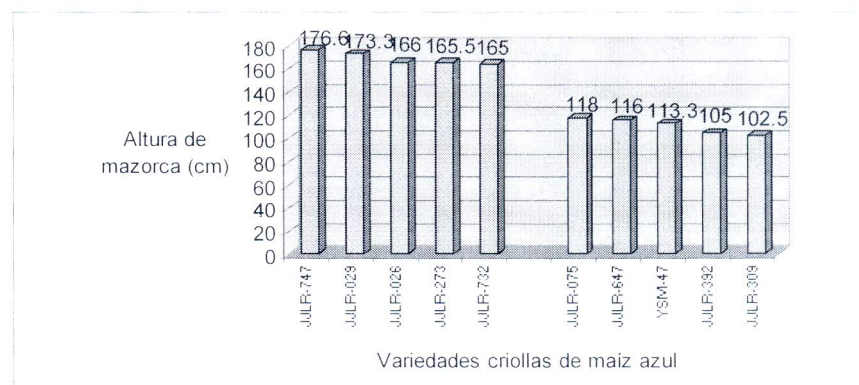


Figura 16. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor altura de mazorca.



4.2.4 Mazorcas por planta (MPP).

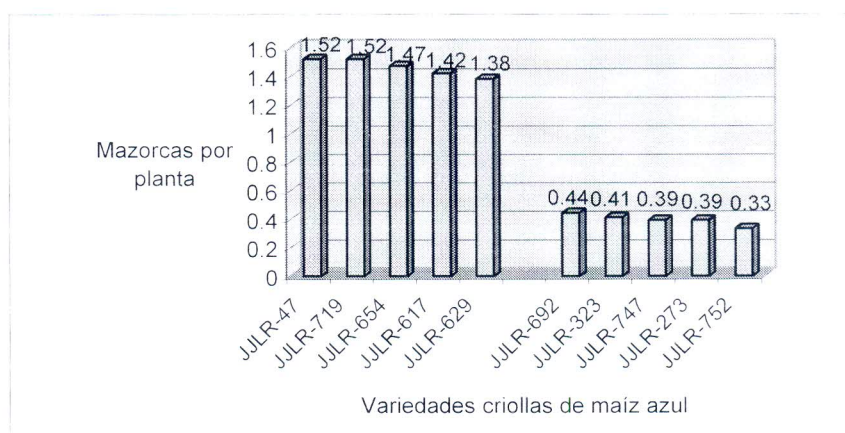
Esta variable está directamente relacionada con el rendimiento, ya que a mayor número de mazorcas cosechadas se obtendrá un mayor rendimiento por unidad de superficie (Giagnoni, 2005). Las variedades con mayor número de mazorcas fueron JJLR-47 (1.52), JJLR-719 (1.52), JJLR-654 (1.47), JJLR617 (1.42) y JJLR-629 (1.38), demostrando mejor adaptación a las condiciones que prevalecieron en el ambiente en que crecieron. Mientras que las poblaciones JJLR-732, JJLR-273, JJLR-747, JJLR-393 y JJLR-692 presentaron el menor número de mazorcas con 0.33, 0.39, 0.39, 0.41 y 0.44, respectivamente (Cuadro 2A; Figura 17). En el mismo Cuadro 2A, se aprecia que los testigos mostraron 1.0 y 1.11 número de mazorcas, valores que están por encima de la media general que fue de 0.92.

El menor número de mazorcas mostrado por algunas poblaciones con mayor número de plantas por parcela, pudo deberse a problemas de esterilidad y pudrición de mazorca, ocasionados por la pobre adaptación de las variedades nativas de maíz azul a las condiciones ambientales de Chapingo. Por otra parte, las variedades produjeron muchos hijuelos lo que disminuyó su capacidad de producción de mazorcas. Adicionalmente, la variación de la cantidad de mazorcas se puede deber a la diferencias genéticas en la capacidad productiva entre variedades, así como a la presencia de enfermedades y daños por lluvia (Miguel, 2003).

De acuerdo con Giagnoni (2005), el número de MPP está directamente relacionado con el número de plantas por parcela (NPP), peso de campo (PDC)

y rendimiento por planta (RPP), variables que dependen del genotipo y de la interacción genotipo-ambiente; por lo que si en la parcela existe mayor número de plantas, es de esperarse que el número de mazorcas también será mayor y por tanto se tendría más PDC Y RPP, situación que sólo se presentó con la variedad JJLR-617, que se ubicó entre las mejores en MPP, PDC y RPP, presentando una asociación positiva entre las tres variables.

Figura 17. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor número de mazorcas por planta.



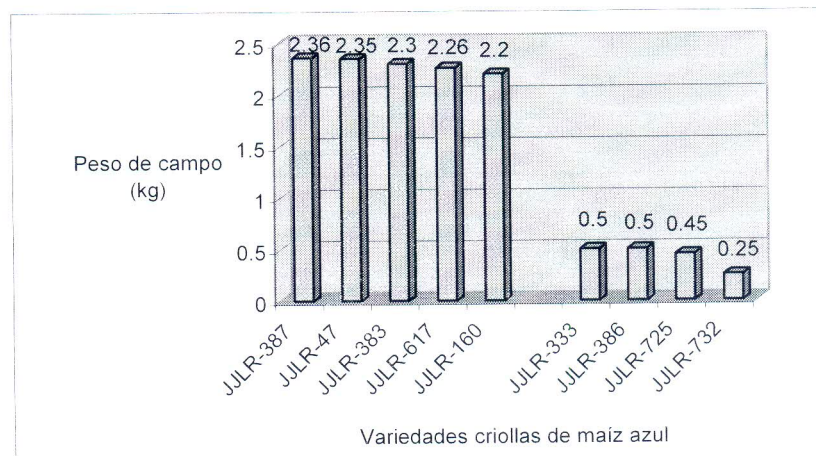
4.2.5 Peso de campo (PDC).

Para esta variable, en el Cuadro 2A y Figura 19 se pueden apreciar diferencias de más de 2 kg parcela⁻¹ entre la variedad de mayor peso contra la de menor expresión; sobresalen las variedades JJLR-387, JJLR-47, JJLR383, JJLR-617 y JJRL-160 con 2.36, 2.35, 2.30, 2.26 y 2.20 kg parcela⁻¹ que presentaron los PDC más altos y, por lo tanto son materiales que se deben de considerar para utilizar su potencial en programas de mejoramiento genético. Por el contrario las variedades de menor PDC fueron JJLR-333, JJLR-386, JJLR-725 y JJLR-732 con 0.50, 0.50, 0.45 y 0.250 kg parcela⁻¹; mientras que

los testigos presentaron un PDC de 1.30 y 1.56 kg parcela⁻¹, valores que estuvieron por encima de la media general de 1.25 kg parcela⁻¹. La mayoría de las variedades expresaron mayor PDC que los testigos, resultados que coinciden en parte con los mencionados por Mejía (1986), Muñoz (1997) y Romero y Muñoz (1996), quienes en estudios similares encontraron que los maíces criollos presentaron mayor rendimiento comparado con maíces mejorados.

En particular, las variedades JJLR-387, JJLR-617 y JJLR-160 que tuvieron mayor PDC, también mostraron mayor RPP. El pobre comportamiento del resto de las variedades probablemente se debió a que los factores ambientales que se presentaron en el sitio de ensayo modificaron significativamente la expresión de sus caracteres, debido a una reducida flexibilidad para ajustar su condición genotípica y fenotípica a situaciones transitorias del ambiente (Muñoz, 1997).

Figura 18. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor peso de campo.

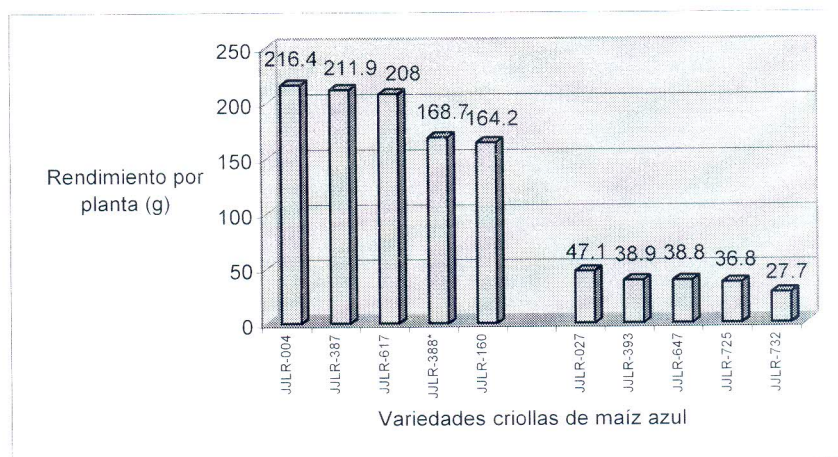


4.2.6 Rendimiento por planta (RPP).

El Cuadro 2A y la Figura 18, permiten observar que los mayores rendimientos por planta correspondieron a las variedades JJLR-04, JJLR-387, JJLR-617, JJLR-388* y JJLR-160 con 216.4, 211.9, 208.0 168.7 y 164.2 g planta⁻¹, debido a que presentaron mayor adaptación a las condiciones ambientales existentes en el sitio de evaluación. Seguidos por los testigos con 106.7 y 131.9 g planta⁻¹. Contrastan con las anteriores por RPP muy bajo, las variedades JJLR-732, JJLR-725, JJLR-647, JJLR-393 y JJLR-027 con 27.7, 36.8, 38.8, 38.9 y 47.1 g planta⁻¹, respectivamente. Algunos autores sugieren que la reducción en rendimiento está asociada con el aumento en el intervalo entre floración masculina y femenina (Miguel, 2003; Miguel *et al.*, 2004), a la falta de suficiente cantidad del polen en el momento de la aparición de los estigmas (Muñoz, 1997), o bien al deterioro del polen bajo condiciones de altas temperaturas (Shoper *et al.*, 1986).

De acuerdo con los resultados obtenidos, los materiales que tuvieron más altos RPP y mayor peso de campo (PDC) fueron de ciclo intermedio, como fue con las variedades JJLR-387, JJLR-617 y JJLR-160. Las variedades de mayor rendimiento son poblaciones de la raza Chalqueño, que se caracteriza por presentar plantas altas con mazorcas grandes y anchas (Herrera, 1999).

Figura 19. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor rendimiento por planta.



4.2.7 Diámetro de mazorca (DMM) y olote (DOL).

Los resultados del diámetro de mazorca (DMM) se presentan en el Cuadro 2A y Figura 20, donde se observa que las variedades criollas que presentaron el mayor diámetro fueron JJLR-648, JJLR-639, JJLR-425, JJLR-396 y JJLR-671 todas con DMM de 4.80 cm; mientras que las variedades que tuvieron el menor diámetro fueron JJLR-309, JJLR-598, JJLR-388*, YSM-69 y YSM-62 que mostraron un diámetro de 3.75, 3.85, 3.85, 3.90 y 3.90 cm, respectivamente. Los testigos expresaron un DMM de 4.46 y 4.40 cm, con lo que están dentro de la media general que fue de 4.42 cm. Uno de los objetivos en los programas de mejoramiento genético es aumentar el grosor de la mazorca y disminuir el diámetro del olote para incrementar la relación grano/olote; situación que sólo se cumplió con las variedades JJLR-648 y JJLR-598, que estuvieron dentro de los materiales de mayor y menor diámetro de mazorca y olote, respectivamente. Para las variedades que fueron superiores en DMM, se les pueden atribuir buenas características productivas, ya que de acuerdo con Arellano (2006),

cuando el diámetro de mazorca es mayor el peso de mazorca se incrementa, por lo que el RPP y PDC aumentan, lo que indica que el rendimiento está asociado positivamente con el diámetro de mazorca.

Para el diámetro del olote (DOL), la media general fue de 2.02 cm, las variedades que con el mayor grosor de olote fueron JJLR-031 (3.03 cm), JJLR-724 (2.40 cm), JJLR-648 (2.30 cm), JJLR-046 (2.30 cm) y JJLR-595 (2.26 cm); y los que mostraron el olote de menor diámetro fueron los materiales YSM-47 (1.76 cm), JJLR-321 (1.75 cm), JJLR-726 (1.73 cm), JJLR-024 (1.66 cm) y JJLR-598 (1.60 cm) (Cuadro 2A y Figura 21). Los testigos presentaron un DOL de 2.16 y 1.96 cm, respectivamente. Lo ideal es tener variedades con mayor diámetro de mazorca y menor diámetro de olote, es decir con granos grandes (Arellano, 2006). Considerando ambas variables, la variedad JJLR-639 resultó ser mejor, por poseer mazorca gruesa y de olote relativamente delgado, lo cual se ve reflejado en un alto porcentaje de grano (84.1%), en el RPP (128 g planta⁻¹) y en PDC (1.33 kg parcela⁻¹). Resultados similares fueron encontrados por Ballardo y Gómez (1998), quienes hallaron una significativa influencia del diámetro de mazorca sobre el PDC.

Figura 20. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor diámetro de mazorca.

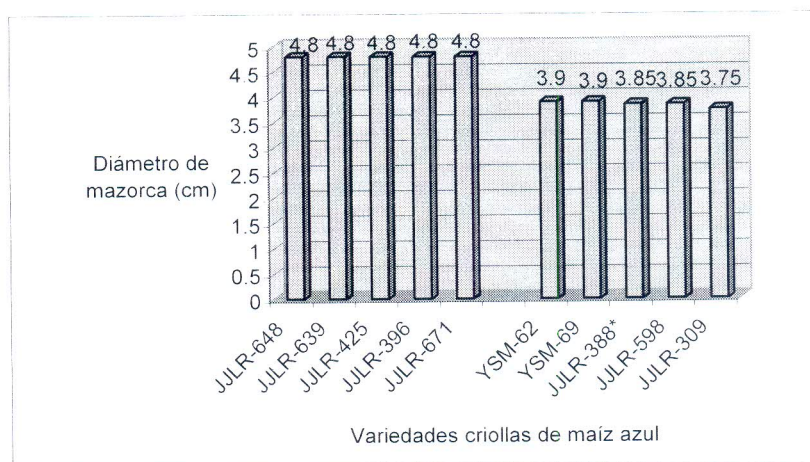
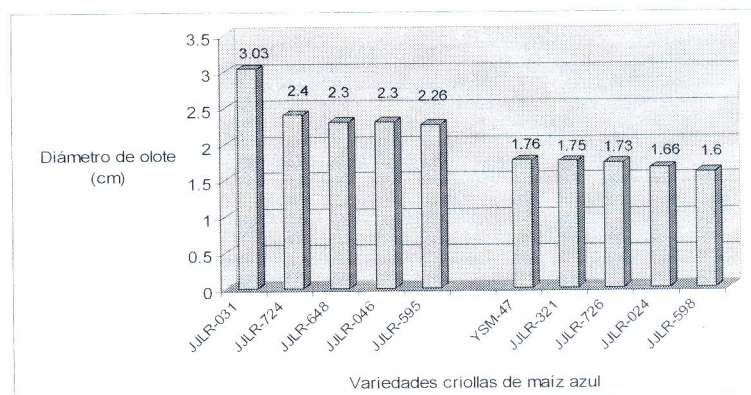


Figura 21. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor diámetro de olote.



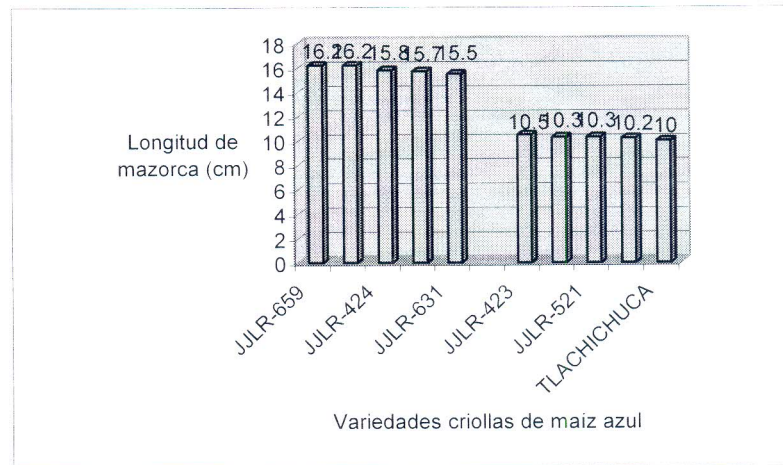
4.2.8 Longitud de mazorca (LM).

Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 2A y la Figura 22 donde se observa que las variedades que tuvieron la mayor longitud de mazorca fueron JJLR-659 (16.2 cm), JJLR-501 (16.2 cm), JJLR-424 (15.8 cm), JJLR-029 (15.7 cm) y JJLR-631 (15.5 cm); y las variedades que presentaron la menor longitud fueron Tlachichuca (10.0 cm), JJLR-427 (10.2 cm), JJLR-521 (10.3 cm), JJLR-426 (10.3 cm) y JJLR-423 (10.5 cm), lo que indica que el ambiente les fue menos favorable; mientras que los testigos manifestaron una LM de 12.8

y 14.6 cm, respectivamente, expresando valores intermedios respecto a la media general que fue de 13.4 cm, la cual fue baja, tomando en cuenta que la mayoría de las variedades nativas evaluadas en este trabajo son de raza Chalqueño, y que de acuerdo con Wellhausen *et al.* (1951), la longitud promedio de la mazorca en los maíces de esta raza es de 16.0 cm; considerando a las variedades que mostraron valores máximos de 16.2 a 15.5 cm en LM, se les pueden atribuir buenas características productivas, ya que el rendimiento está relacionado directamente con la longitud de mazorca. Para la mayoría de las variedades que tuvieron mazorcas pequeñas lo anterior hace suponer que los materiales en una etapa de su desarrollo tuvieron algún tipo de deficiencia lo que limitó la expresión de su potencial genético. La variación observada para este carácter pudo deberse a la presencia de factores adversos como la falta de agua y las altas temperaturas que se registraron en las etapas de antesis y llenado del grano, lo que limitó la expresión de su potencial genético.

La longitud de mazorca es una variable que está muy asociada al rendimiento, y un aspecto importante que se observó en este trabajo es la relativa uniformidad en el tamaño de la mazorca de las diferentes variedades; posiblemente esto sea resultado de la selección que hacen los productores para la obtención de la semilla para la siembra del siguiente ciclo de cultivo, ya que uno de los principales parámetros de selección es la uniformidad en el tamaño y aspecto de las mazorcas (Taboada, 2000).

Figura 22. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor longitud de mazorca.



4.2.9 Número de hileras por mazorca (NHM) y número de granos por hilera (NGH).

El Cuadro 2A y la Figura 23, muestran las variedades nativas que presentaron el mayor número de hileras por mazorca (NHM), las cuales fueron JJLR-388*, Ixtlahuaca, JJLR-425, JJLR-098 y JJLR-424 con 17.0, 17.0, 16.3, 16.0 y 16.0 hileras por mazorca, respectivamente; mientras que las variedades con el menor número de hileras fueron JJLR-395, JJLR-688, JJLR-393 y JJLR-046 con 11.5, 11.6, 12.0 y 12.0 hileras por mazorca. Para los testigos el promedio fue de 15.6 y 14.3 NHM, por lo que se encontraron por encima de la media general que fue de 14.2 hileras por mazorca. Únicamente la variedad JJLR-424, fue la presentó una asociación positiva entre LM y NHM, lo cual resulta de interés para hacer una futura selección de este material. De alguna manera esta variación en el número de hileras concuerda con Cortés (2000) y Seminario (1991) quienes señalan que el número de hileras es un carácter genético que no es afectado fácilmente por las condiciones

ambientales y de cultivo, y que la heterogeneidad existente en la constitución genética de las variedades nativas se debe a las frecuentes recombinaciones que se dan entre ellas al ser plantas de polinización libre.

Para la variable número de granos por hilera (NGH), en el Cuadro 2A y Figura 24, se puede observar que las variedades criollas que presentaron el mejor promedio fueron JJLR-388, JJLR-503, JJLR-501, JJLR-321 y JJLR-095 con 34.7, 34.0, 33.5, 33.2 y 33.0 granos por hilera; las variedades con el menor número fueron JYL-395, YSM-69, YSM-62, Tlachichuca y JJLR-423 con 20.5, 21.0, 21.5, 21.5 y 21.7 granos por hilera. Los testigos tuvieron un promedio de 24.3 y 28.5 granos por hilera, mientras que la media general fue de 27.8 NGH. Las variaciones que se obtuvieron para esta variable, se explican básicamente porque existen varios factores que pueden reducir la proporción de flores polinizadas, fertilizadas, y de granos que continúan su desarrollo hasta completar el llenado. Estos factores pueden ser: 1) Desección del polen, 2) Marchitamiento de estilos y estigmas antes de la polinización, 3) Desfase entre el tiempo de dehiscencia de anteras (emisión de polen) y exposición de estigmas, y 4) Déficit de nutrientes para satisfacer la demanda de los granos como consecuencia de la reducida área foliar que puede producir la planta (Seminario, 1991). Si se supone que no existieron limitaciones en cuanto a viabilidad del polen y receptividad de estigmas (lo cual no se comprobó) por lo que hubo una adecuada fertilización para la mayoría de inflorescencias, la falta de formación de granos probablemente se debió a un inadecuado suministro de fotosintatos, posiblemente debido a la falta de agua y nutrientes durante la etapa de llenado de grano (Tanaka y Yamaguchi, 1983).

Figura 23. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor número de hileras por mazorca.

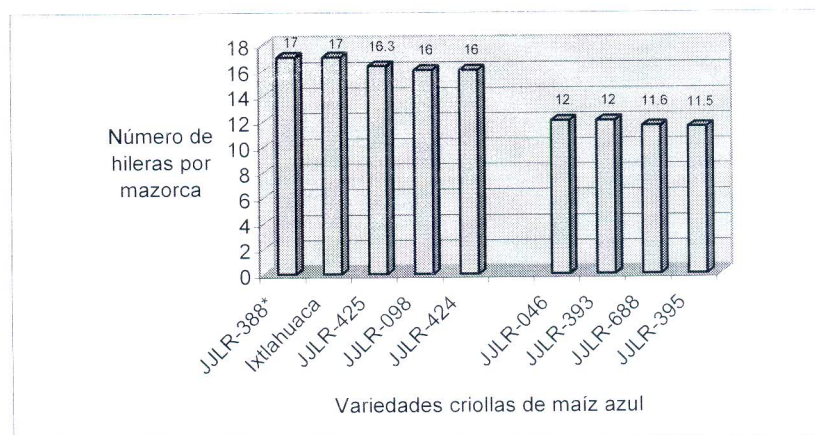
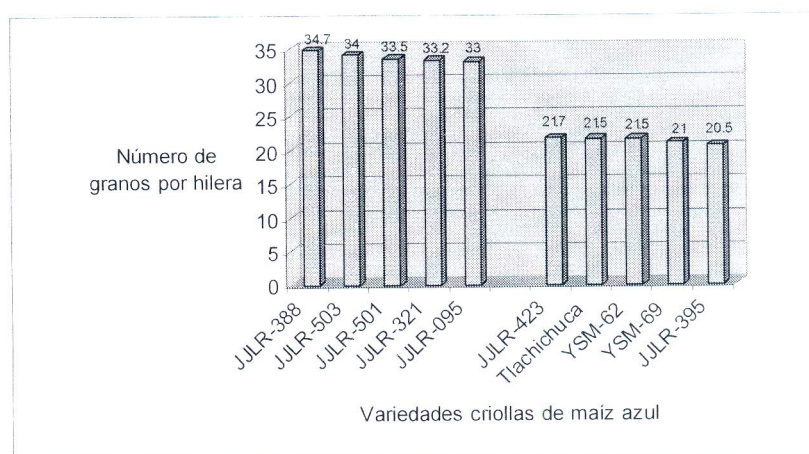


Figura 24. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor número de granos por hilera.

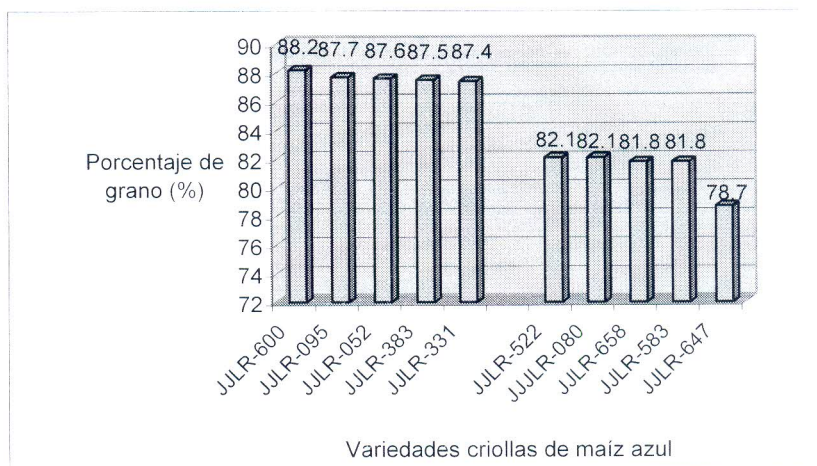


4.2.10 Porcentaje de grano (PG).

En relación a esta variable, la media general fue de 84.4%, sobresaliendo las variedades nativas JJLR-600 (88.2%), JJLR-095 (87.7%), JJLR-052 (87.6%), JJLR-383 (87.5%) y JJLR-331 (87.4%) que obtuvieron los porcentajes más altos; contrariamente las variedades JJLR-647 (78.7%), JJLR-583 (81.8%), JJLR-658 (81.8%), JJLR-080 (82.1%) y JJLR-522 (82.1%) mostraron los

porcentajes más bajos (Cuadro 2A y Figura 25). Los testigos mostraron un PG de 83.3 y 86.3%, respectivamente. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Muñoz (1997), quien encontró que el PG de variedades nativas fue alto en comparación con híbridos comerciales. Estos resultados pueden deberse a que el agricultor, año con año selecciona las mazorcas para semilla tomando en cuenta el grosor del olote, buscando siempre que sea lo más delgado posible para obtener granos más grandes, aumentando el porcentaje de desgrane y por lo tanto incrementando el rendimiento de grano.

Figura 25. Variedades nativas de maíz azul con mayor y menor porcentaje de grano.



4.3 Análisis de Correlación Simple.

La matriz de correlación entre cada par de variables analizadas se presenta en el Cuadro 7, donde se observa que el valor más alto de correlación se obtuvo entre MPP y RPP ($r = 0.819$). La variable MPP presentó una baja relación positiva con PG ($r = 0.277$), con PDC ($r = 0.622$) y una baja correlación negativa con NPP ($r = -0.239$), lo cual indica que la presencia de un menor número de plantas ocasionó un mayor número de mazorcas por planta.

La disminución del NPP favoreció a que fue menor la competencia por humedad y nutrientes durante el período crítico de la polinización y formación del grano, y esto se ve reflejado en la formación de un mayor número de mazorcas.

La variable NPP tuvo una correlación negativa con DFM y DFF ($r = -0.247$ y $r = -0.191$), lo que muestra que a menor NPP mayor el período de floración masculina y femenina. Estos resultados son contrarios a los obtenidos por Muñoz (1997) quién encontró una correlación positiva entre los períodos de floración masculina y femenina con el número de plantas por parcela. También, NPP tuvo una asociación negativa con RPP ($r = -0.239$), es decir, a mayor número de plantas por parcela disminuye el rendimiento por planta, lo cual no concuerda con los resultados de Ballardo y Gómez (1998), quienes reportan una correlación positiva entre NPP con RPP; pero hay que considerar que el rendimiento está condicionado por la densidad de población, ya que existe un límite de plantas por hectárea, lo cual es debido a la competencia por espacio, luz, agua y nutrientes entre plantas, y después de dicho límite en lugar de incrementarse el rendimiento éste se reduce debido al aumento de la población; sin embargo NPP se asoció positivamente con PDC con una baja correlación de $r = 0.387$, situación que concuerda con lo reportado por Muñoz (1997).

Para las variables DFM y DFF se observa una correlación positiva ($r = 0.704$), lo que indica que a mayor número de días de floración masculina le correspondió un mayor número de días de floración femenina, estos resultados sugieren que no hubo limitantes de disponibilidad de polen viable para que se llevara a cabo la polinización adecuada de los estigmas. La variable DFM tuvo

una baja correlación negativa con PDC ($r = -0.265$), lo que sugiere que a menor período de floración masculina aumento el peso de las mazorcas. Esta relación podría explicarse debido a una mayor eficiencia de las variedades más precoces; ya que uno de los períodos con más requerimientos de agua y nutrientes es en la floración masculina, y al presentarse un período más corto de floración se tuvo menor demanda de estos elementos, y por consiguiente fueron mejor aprovechados para la formación y obtención de un mayor número de granos por mazorca (López *et al.*, 2004).

Altura de planta (AP) y mazorca (AM) presentaron una moderada asociación positiva ($r = 0.502$), lo cual concuerda con los resultados de Miguel (2003) y Herrera (1999) que reportan que la altura de planta correlacionó positivamente con altura de mazorca, lo cual indica que entre más baja sea la planta, será menor la altura de la mazorca.

La longitud de mazorca (LM), presentó una correlación positiva con las variables DMM ($r = 0.344$), NGH ($r = 0.653$) y DOL ($r = 0.219$). Estos resultados indican que a mayor tamaño de mazorca corresponde mayor diámetro medio de mazorca y olote, así como mayor número de granos.

La variable DMM mostró una baja correlación positiva con NHM ($R = 0.322$), con NGH ($r = 0.316$) y con DOL ($r = 0.343$), lo que indica que en las variedades con mazorcas más gruesas tendrán mayor número de hileras y de granos, pero también presentarán mayor grosor del olote, ocasionando la reducción del tamaño del grano.

La variable NHM tuvo una muy baja asociación positiva con NGH ($r = 0.174$), con PS ($r = 0.175$) y con DOL ($r = 0.225$), indicando que a mayor

número de hileras por mazorca se tuvo un mayor número de granos por hilera, lo que se reflejó en variedades nativas con granos pequeños, lo cual coincide con lo mencionado por Herrera (1999) en su reporte con maíces criollos de origen Chalqueño.

El NGH mostró, también, una baja correlación positiva con PG ($r = 0.274$), con PDC ($r = 0.207$) y con PS ($r = 0.219$). Estos resultados indican que a mayor número de granos por hilera la variedad tendrá un mayor peso de mazorca, tal como lo señala Cortés (2000) quién encontró una correlación positiva entre NGH y rendimiento en maíces criollos de Oaxaca.

La variable PG presentó correlación positiva con PDC ($r = 0.475$), con RPP ($r = 0.382$) y con PS ($r = 0.348$); estos resultados indican que un mayor porcentaje de grano fue resultado de un mayor peso de mazorcas y un tamaño más grande de los granos, lo cual fue debido a que los factores ambientales del sitio de evaluación incidieron sobre la etapa de llenado de grano, además del potencial genético de las variedades nativas que afectaron favorablemente la relación entre el peso de grano/mazorca (López *et al.*, 2004).

El PDC mostró una correlación positiva con RPP ($r = 0.741$), lo que indica la relación estrecha que tienen las variables PDC y RPP, ya que entre mayor peso tuvo la(s) mazorca(s) de una planta se produjo más rendimiento en la misma. Esto indica que el peso de la mazorca dependió del potencial genético de la planta y de la competencia intraplanta, principalmente representada por el número de mazorcas producidas por la planta y el número de granos en cada una de ellas. Estos resultados los confirman Ballardo y Gómez (1998) que determinaron el mayor rendimiento por planta de variedades criollas de maíz.

Así mismo, PDC tuvo una baja correlación positiva con PS ($r = 0.256$). Este resultado indica que al tener un elevado peso de mazorca se obtuvieron granos de mayor peso y tamaño, debido a que el peso de la mazorca está influenciado por el peso individual del grano, el cual está determinado por la tasa del período efectivo del llenado de grano (López *et al.*, 2004).

La variable PS tuvo una baja asociación positiva con RPP ($r = 0.229$), indicando que cuando los granos fueron de mayor peso y tamaño se obtuvo un mayor rendimiento de la planta; esta relación posiblemente se debió a que en el período de formación del grano, los nutrientes disponibles en la planta fueron utilizados en el crecimiento del grano (López *et al.*, 2004); resultados que coinciden con Cortés (2000) quien encontró una correlación positiva entre el rendimiento y el peso de 200 granos en variedades de maíces criollos.

Cuadro 7. Correlación entre las variables analizadas en variedades nativas de maíz azul.

VARIABLE	DFM	DFF	AP	AM	MPP	LM	DMM	NHM	NGH	PG	PDC	RPP	PS	DOL
NPP	-0.247**	-0.191**	-0.020	-0.117	-0.239**	0.047	-0.127	0.038	0.068	0.099	0.387**	-0.239**	0.022	-0.049
DFM		0.704**	0.071	0.081	-0.143	-0.107	0.032	-0.028	-0.126	-0.126	-0.265**	-0.118	-0.033	-0.018
DFF			0.075	0.088	-0.076	-0.044	0.044	0.053	-0.112	-0.068	-0.143	-0.012	-0.027	0.017
AP				0.562**	0.038	0.054	0.043	0.054	0.019	0.104	0.060	0.093	0.067	-0.002
AM					0.017	0.059	0.100	0.036	0.037	0.075	-0.016	0.053	0.043	0.019
MPP						0.033	0.071	0.039	0.081	0.277**	0.622**	0.819**	0.007	0.017
LM							0.334**	0.114	0.653**	0.158*	0.133	0.096	0.057	0.219**
DMM								0.322**	0.316**	0.010	-0.002	0.104	0.124	0.343**
NHM									0.174**	0.112	0.158	0.140	0.175**	0.225**
NGH										0.274**	0.207**	0.164*	0.219**	0.124
PG											0.475**	0.382**	0.348**	-0.152*
PDC												0.741**	0.256**	-0.009
RPP													0.229**	0.036
PS														-0.039

NPP = Número de plantas por parcela; DFM = Días a floración masculina; DFF = Días a floración femenina; AP = Altura de planta; AM = Altura de mazorca; MPP = Mazorcas por planta; LM = Longitud de mazorca; DMM = Diámetro de mazorca; NHM = Número de hileras por mazorca; NGH = Número de granos por hilera; PG = Porcentaje de grano; PDC = Peso de campo; RPP = Rendimiento por planta; PS = Peso de 200 granos; DOL = Diámetro del olote; ASP = Aspecto de la planta. ** Significancia con ≤ 0.01 ; * Significancia con ≤ 0.05 .

4.4 Análisis multivariados.

Con el propósito de caracterizar las variedades nativas de maíz azul con la aplicación de los análisis multivariados, primeramente se realizó una selección de variables con el procedimiento STEPDISC de SAS. Las variables seleccionadas en el análisis fueron: DFF, AP, MPP, DMM, NHM, NGH, PG, PDC, RPP Y DOL.

A partir de los caracteres seleccionados se realizó el análisis de agrupamiento mediante el uso de distancias euclidianas a partir de datos estandarizados realizado con la mínima varianza de Ward (Figura 26). Para determinar la altura de corte, se atendió a los criterios de la pseudoestadística del cuadrado de Hotelling (PST^2) y el criterio cúbico de agrupamiento (ccc), a partir de los cuales se determinó una altura de corte que definió cinco grupos (Figura 26).

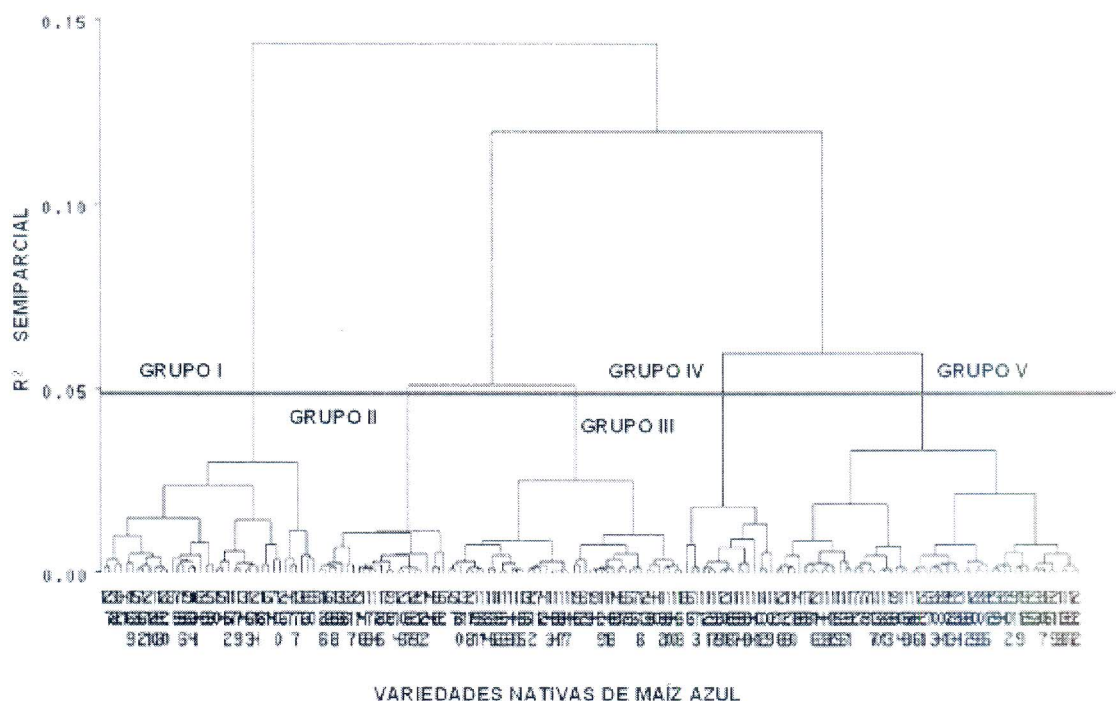


Figura 26. Dendrograma jerárquico de 175 variedades nativas de maíz azul obtenido mediante el método de Ward y el uso de distancias euclidianas cuadradas. La línea roja indica la altura de corte y el número de grupos formados.

En el dendrograma se observa que a la distancia de 0.05 se formaron cinco grupos, en donde cada uno agrupó variedades por la similitud en el comportamiento de los caracteres agronómicos medidos, aunque las poblaciones fueron colectadas en diferentes regiones agrícolas de los Valles Altos. El grupo I conjuntó maíces que, en su mayoría, son procedentes de diversas localidades del Estado de México; aquí se ubicaron materiales como las variedades JJLR-321, JJLR-309, JJLR-033 y JJLR-598 que predominaron en el carácter de menor altura de planta. El segundo grupo estuvo conformado, principalmente, por poblaciones colectadas en los estados de México y Puebla; aquí se localizó la variedad JJLR-160 que fue la más prometedora en los

caracteres de PDC y RPP; así como la JJLR-098 y JJLR-424 que fueron de las mejores para la variable de NHM. El tercer grupo fue conformado, en su mayoría, por colectas del Estado de Puebla; aquí sobresalieron las poblaciones JJLR-387 y JJLR-383, que fueron las mejores para las variables RPP y PDC, respectivamente. En el cuarto grupo se distinguieron las variedades JJLR-024 y JJLR-598 con el menor diámetro de olote, y la JJLR-648 con el mayor diámetro de mazorca. En el grupo cinco se agruparon la mayoría de las variedades, como JJLR-503, JJLR-519, JJLR-056, JJLR-651, JJLR-628 y JJLR-641 que fueron las más precoces.

En cada uno de los grupos se ubicaron las variedades con el mayor parentesco genético lo que origino que manifestarán caracteres agronómicos similares; pero hay que considerar que posiblemente han sido seleccionadas en condiciones ambientales parecidas, y quizá también en un sistema de manejo similar, lo cual explica sus similitudes. Por otra parte, la influencia de las condiciones ambientales en el sitio de evaluación, pudo haber ocasionado que las variedades se ubicarán en diferentes agrupaciones, debido a que no todos las poblaciones manifestaron su máxima expresión genética como lo habrían hecho en los ambientes de donde se colectaron.

Se realizó un análisis discriminante canónico para corroborar la formación de los grupos y los caracteres más relevantes en la definición de éstos. A partir de este análisis, se definieron tres funciones discriminantes que describieron 98% de la variabilidad total presente en los datos (Cuadro 8).

Cuadro 8. Valores propios de funciones discriminantes canónicas de cinco grupos de variedades nativas de maíz azul.

Variable discriminante canónica	Valor propio	Proporción	Proporción acumulada
VDC 1	3.76	0.58	0.58
VDC 2	1.86	0.29	0.87
VDC 3	0.70	0.10	0.98
VDC 4	0.10	0.01	1.00

La estructura total canónica (Cuadro 9) que representa a las correlaciones lineales entre las funciones discriminantes generadas con las variables originales, determinaron que la variable discriminante canónica 1 (VDC 1) tuvo mayor asociación positiva con los caracteres DFF y AP y asociación negativa con PDC y RPP; es decir, valores altos de la VDC 1 representa variedades altas y de ciclo tardío para floración femenina, pero con bajo rendimiento. Con respecto a la variable discriminante canónica VDC 2, los caracteres que tuvieron relación positiva con ésta fueron PDC, NHM y DMM; lo que identifica a variedades con mazorcas gruesas y alto número de hileras, lo que repercutió en un mayor peso de las mazorcas (Cuadro 9). La VDC 3, tuvo relación positiva con MPP; y negativa con NHM, lo que permite establecer que hubo poblaciones con alto número de mazorcas por planta pero con menor número de hileras (Cuadro 9).

Cuadro 9. Estructura total canónica de variables discriminantes canónicas definidas a partir de cinco grupos de variedades nativas de maíz azul.

Variable	VDC 1	VDC 2	VDC 3
DFF	0.870	0.132	0.154
AP	0.914	0.272	0.192
MPP	0.108	0.342	0.374
DMM	-0.120	0.551	-0.482
NHM	-0.020	0.595	-0.582
NGH	-0.051	0.488	-0.127
PG	-0.253	0.559	-0.401
PDC	-0.372	0.675	-0.576
RPP	-0.493	0.487	0.222
DOL	-0.267	0.324	0.257

Debido a que en cada variedad es posible obtener un valor de una variable discriminante canónica, se puede representar el comportamiento de estas poblaciones y corroborar la agrupación propuesta del análisis de agrupamiento (Figura 26), mediante un sistema cartesiano en donde los ejes son representados por las variables discriminantes canónicas: VDC 1 (que explicó el 58.4% de la variabilidad), VDC 2 (que describió el 29% de la variación) y VDC 3 (que explicó el 10% de la variabilidad).

En la Figura 27, se muestra que en el segundo cuadrante, el grupo 1 conjunto variedades que presentaron plantas precoces y de baja altura que produjeron mazorcas con mayor peso como los materiales JJLR-160 y JJLR-387; este grupo está claramente separado del grupo 2 que mostró variedades con un ciclo de floración femenina intermedio, pero teniendo mazorcas de

mayor peso; aquí se ubicaron variedades como la JJLR-04. En el tercer cuadrante se ubicó el grupo 3 que contiene las poblaciones con ciclo de floración intermedio que dieron mazorcas de poco peso como la variedad JJLR-404. Entre los cuadrantes III y IV, se ubicó el grupo 4 con variedades de ciclo intermedio, pero que produjeron mazorcas con muy poco peso, como sucedió con la variedad JJLR-024. En el primer cuadrante, se colocó el grupo 5 con poblaciones que contenían plantas con mayor altura y de ciclo tardío que produjeron mazorcas de mayor peso como la población JJLR-098.

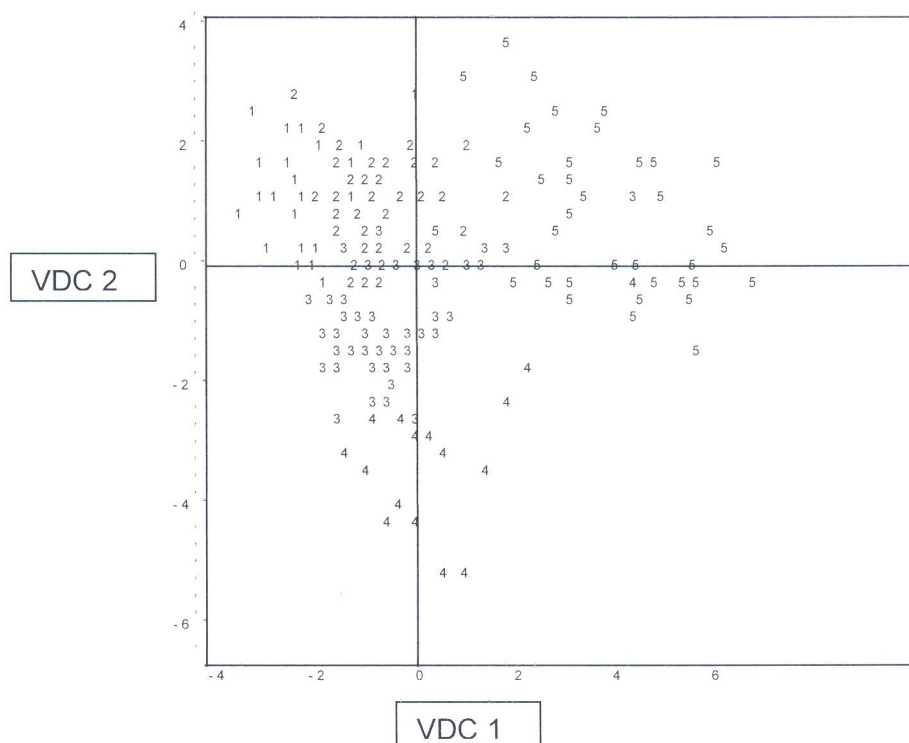


Figura 27. Representación gráfica de las variables discriminantes canónicas VDC 1 y VDC 2 que definen cinco grupos de las 175 variedades nativas de maíz azul.

En la Figura 28, se presenta la agrupación obtenida para las variables canónicas VDC 1 y VDC 3; se observa que en cuadrante superior izquierdo se ubicó el grupo 1 formado con variedades precoces y con mayor número de

mazorcas por planta (MPP) como las variedades JJLR-291 y JJLR-426. En el tercer cuadrante se conformaron los grupos 2 y 3, ambos con poblaciones precoces, pero con pocas mazorcas por planta, como sucedió con las variedades JJLR-026, JJLR-631 (del grupo 2), JJLR-046 y JJLR-659 (del grupo 3). Entre los cuadrantes 1 y 2, se formó la agrupación 4 con variedades de ciclo intermedio y mayor MPP como fue con las variedades JJLR-331 y JJLR-598. En los cuadrantes 1 y 4, se formó la agrupación 5 con variedades de ciclo tardío con un elevado número de mazorcas por planta como la variedad JJLR-595, o con un bajo MPP como la población JJLR-658.

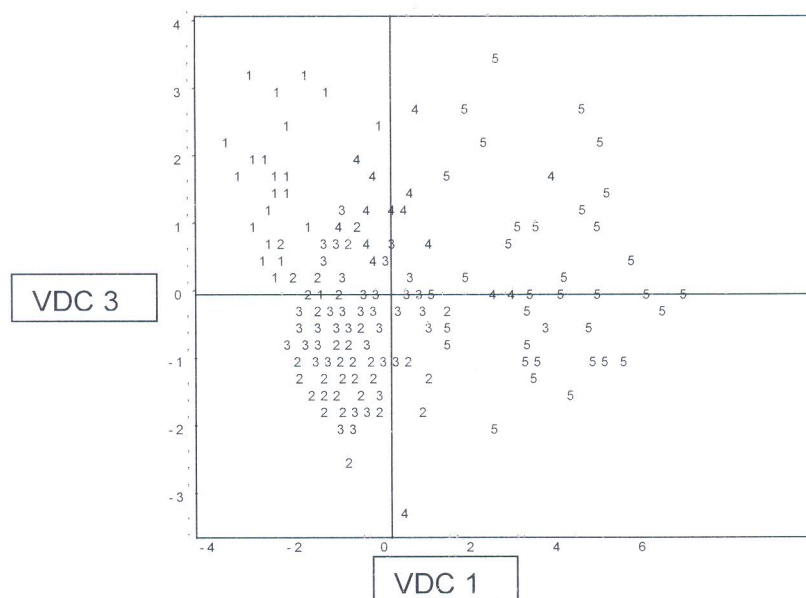


Figura 28. Representación gráfica de las variables discriminantes canónicas VDC 1 y VDC 3 que definen cinco grupos de las 175 variedades nativas de maíz azul.

Con relación a las variables discriminantes canónicas VDC 2 y VDC 3, en la Figura 29 se muestran los agrupamientos obtenidos; como se puede observar en el cuadrante 1, se ubicó el grupo 1 con poblaciones que tuvieron altos PDC y MPP, es decir, que presentaron mazorcas pesadas en un elevado número por

planta, como las variedades JJLR-383 y JJLR-387. En el mismo cuadrante se encontró a la agrupación 5 formada con materiales que, también, tuvieron un mayor número de mazorcas y pesadas por planta. En el cuadrante 2 se ubicó el grupo 4 que conjunto poblaciones un mayor número de mazorcas por planta, pero las mazorcas tuvieron poco peso, aspectos que se presentaron en las poblaciones JJLR-309 y JJLR-598. En cuadrante 3, se observa al grupo 3 que conjunto materiales con pocas mazorcas y de bajo peso por planta, un ejemplo son las variedades JJLR-027 y JJLR-029. En el cuadrante 4, se localizó al grupo 2 formado con poblaciones que presentaron plantas con pocas mazorcas, pero con un elevado peso, como sucedió con los materiales JJLR-639 y JJLR-428.

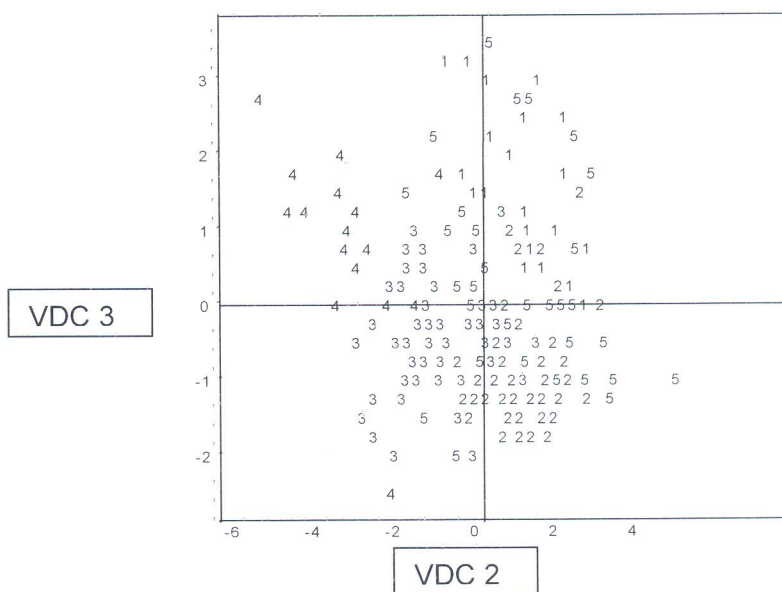


Figura 29. Representación gráfica de las variables discriminantes canónicas VDC 2 y VDC 3 que definen cinco grupos de las 175 variedades nativas de maíz azul.

La distancia entre el centroide de grupos (Cuadro 10) y sus correspondientes pruebas estadísticas indicaron que los grupos fueron diferentes.

Cuadro 10. Distancia estadística generalizada entre centroides de grupos.

GRUPO	2	3	4	5
1	11.49**	18.22**	26.19**	46.69**
2		10.19**	25.34**	39.41**
3			10.83**	42.74**
4				26.06**

** Altamente significativo con $\alpha \leq 0.001$

Los resultados mostraron estadísticamente las similitudes y disimilitudes observadas en el análisis gráfico del discriminante canónico y de agrupaciones. Se determinó que en ambos tipos de análisis tuvieron los mismos resultados al mantener la misma agrupación de variedades nativas de maíz azul. Así mismo, los conjuntos generados de poblaciones correspondieron con el hábito de crecimiento y rendimiento. En conjunto, dichos análisis fueron eficientes ya que demostraron la amplia diversidad genética que existe entre las variedades nativas caracterizadas en este estudio; además, permitieron conocer la dispersión y agrupación de acuerdo a su similitud entre las variedades nativas conforme a las variables agronómicas evaluadas, lo que facilitó la caracterización de los materiales y permitió detectar las mejores poblaciones que presentaron los caracteres agronómicos deseables.

Con relación a la asociación de variables detectadas a través de la interpretación de las variables discriminantes y de las Figuras 27 ,28 y 29, es posible mencionar que se presentaron variedades con plantas con ciclo precoz,

intermedio y tardío que produjeron mazorcas pesadas; además, presentaron un alto número de mazorcas por planta.

En el Cuadro 4A (Anexo), se presentan las variedades nativas que conformaron cada uno de los cinco grupos originados de las variables discriminantes canónicas.

Caracterización Molecular.

Con 50 mg de tejido liofilizado de hoja, usando el aparato automatizado para la extracción de DNA en maíz, se obtuvo suficiente cantidad de DNA con alta pureza para realizar todos los análisis en cada una de las muestras procesadas. En el análisis con los marcadores de microsatélites (SSR), éstos amplificaron una o dos bandas de ADN por cada par de iniciadores dentro de cada una de las 175 muestras (Figuras 30, 31, 32, 33). Estas bandas son el resultado de la herencia materna o paterna y del tamaño de los alelos, los cuales desde el punto de vista molecular, se definen como fragmentos de DNA de diferente tamaño o longitud que son utilizados en la identificación de individuos (Yan *et al.*, 2005). Cuando se obtuvo una sola banda ésta representó homocigosis para ese locus específico dentro del cromosoma analizado, mientras que la presencia de dos bandas indica heterocigosis; la frecuencia de ambas condiciones se presenta en el Cuadro 13. No obstante, hay que señalar que estos resultados no representan el porcentaje total de homocigosis y heterocigosis de las muestras analizadas, pues sólo es el reflejo de los 10 pares de iniciadores usados, lo que permite tener una estimación aproximada del grado de homogeneidad genética de las muestras. En el Cuadro 11, se puede

observar que el mayor porcentaje de homocigosis lo presentaron los marcadores SSR phi062, phi093 y phi121 con el 100%; mientras que la heterocigosis más elevada la presentaron los marcadores SSR phi085 y phi159819 con 96 y 95.8%, respectivamente. La formación de grupos de amplificación simultánea con los iniciadores, optimizó el tiempo requerido para las electroforesis y análisis respectivos (Cuadro 1).

Como fue muy difícil establecer a simple vista si existía o no polimorfismo entre las bandas observadas para cada locus en las 175 muestras analizadas, debido a que su perfil de bandeo fue muy parecido, se procedió a establecer rangos de peso molecular (pb) para las bandas de cada locus, con base en el tamaño del fragmento reportado en el Maize Data Bank (<http://www.agron.missouri.edu/Coop/SSR-Probes/SSR1.html>). En el Cuadro 3A (Anexo) se presentan los rangos determinados para los 10 marcadores SSR. Una vez determinadas las bandas, se construyó la matriz binaria con los resultados transformados para cada locus; presencia de banda = 1, ausencia de banda = 0.

Una vez establecidos los rangos de peso molecular (pb) para cada locus, se determinó que los 10 marcadores SSR ensayados en este estudio amplificaron un total de 158 bandas intensas, de las cuales 157 fueron polimórficas, con un promedio de 15.8 bandas por locus. El alto número de alelos por locus confirma la amplia base genética de las variedades nativas de maíz azul. El número de bandas por marcador SSR varió de 1 (phi121) a 24 (phi115) (Cuadro 11). El número de bandas promedio por marcador obtenido en este estudio fue mayor que el detectado por Lu y Bernardo (2001) y Warburton *et al.* (2002), quienes

observaron 4.9 bandas por locus cuando analizaron 83 y 85 *loci* SSR en 40 y 57 líneas de maíz, respectivamente. Otros autores obtuvieron también un promedio de 5.0 bandas por locus en trabajos similares realizados en maíz (Hrvoje *et al.*, 2007; Vaz Patto *et al.*, 2004).

Cuadro 11. Porcentaje de homocigosis y heterocigosis, número de bandas polimórficas y contenido de información polimórfica (PIC) para los SSR utilizados en la caracterización molecular de 175 variedades nativas de maíz azul.

SSR	Homocigosis (%)	Heterocigosis (%)	Bandas polimórficas	PIC
phi051	36.2	63.8	17	0.78
phi115	47.9	52.1	24	0.71
phi062	100.0	---	10	0.76
phi033	81.2	18.8	20	0.80
phi093	100.0	---	12	0.89
phi085	4.0	96.0	17	0.90
phi121	100.0	---	0	----
phi96342	15.2	84.8	23	0.83
phi159819	4.2	95.8	13	0.88
phi448880	42.9	57.1	21	0.67
Total			157	

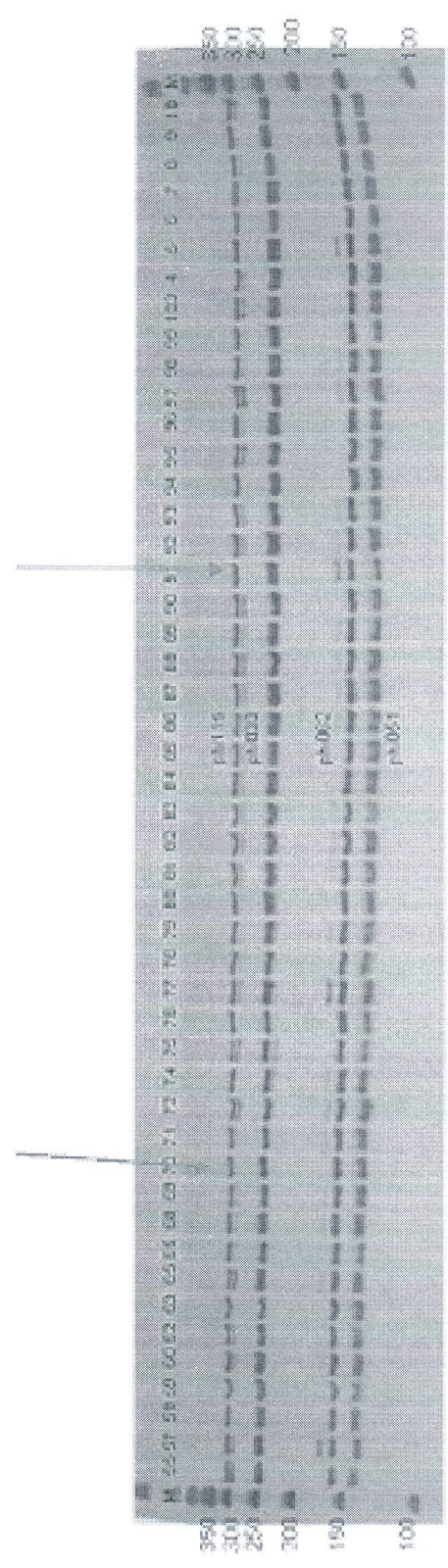
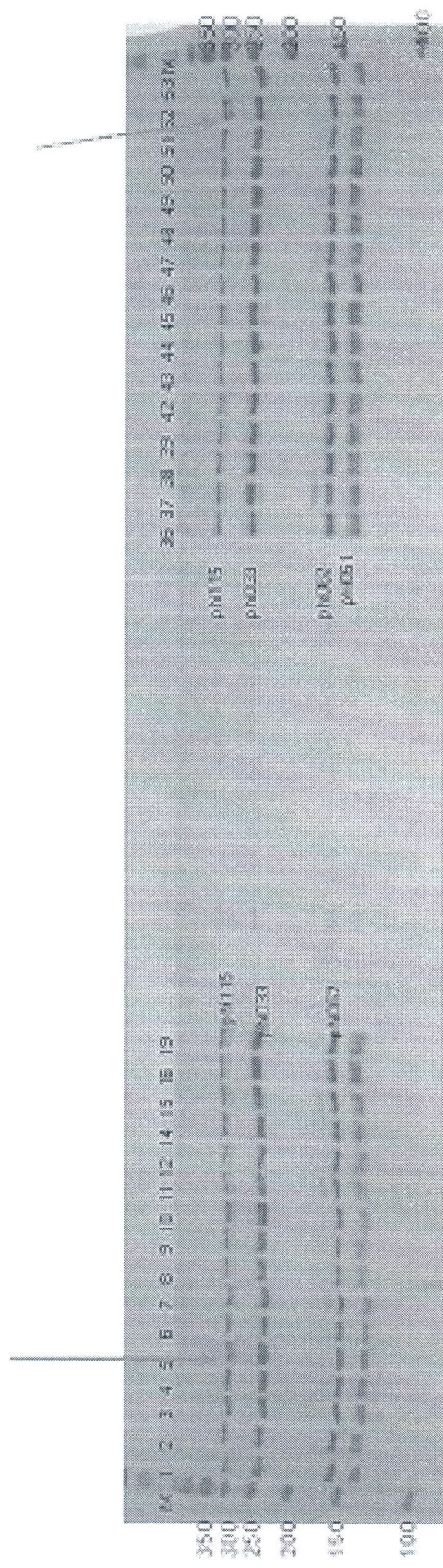


Figura 30. Perfil de bandeo obtenido en los loci phi115, phi033, phi062 y phi051 para las 175 variedades nativas de maíz azul. Las flechas indican polimorfismo.

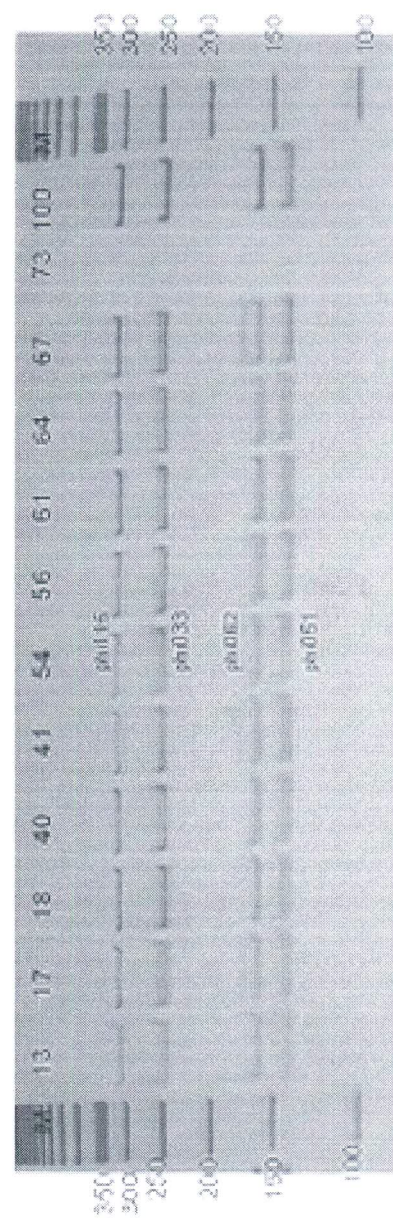
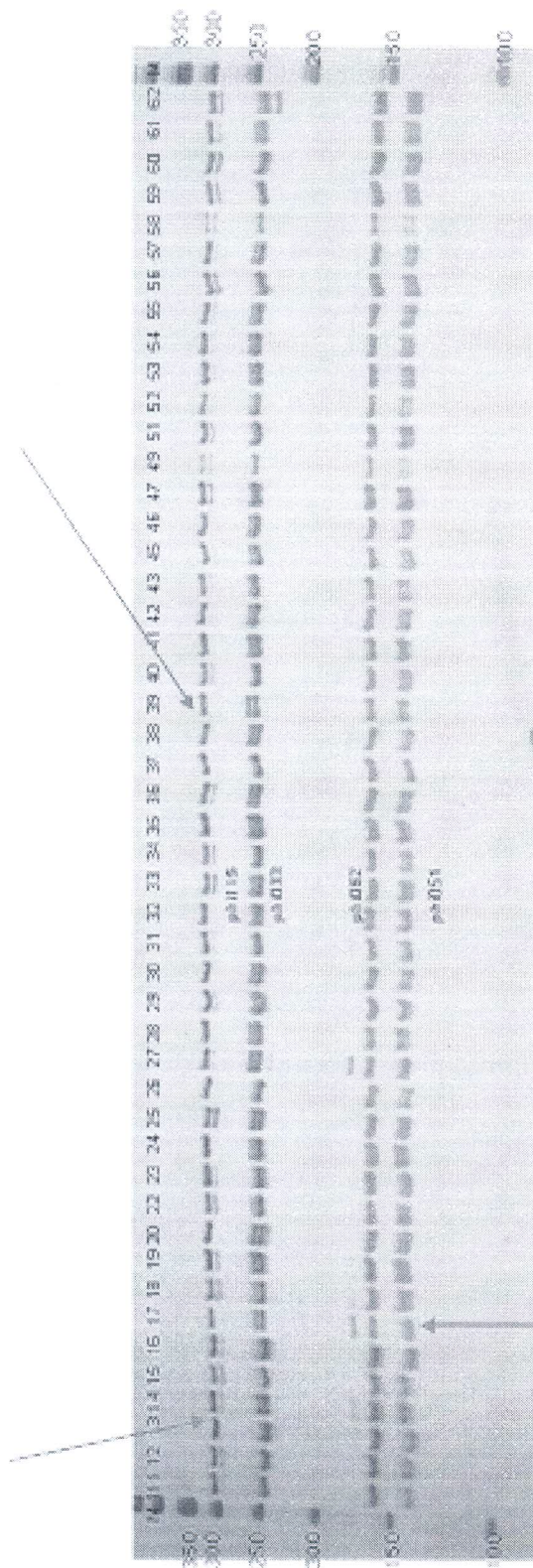


Figura 30. Continuación

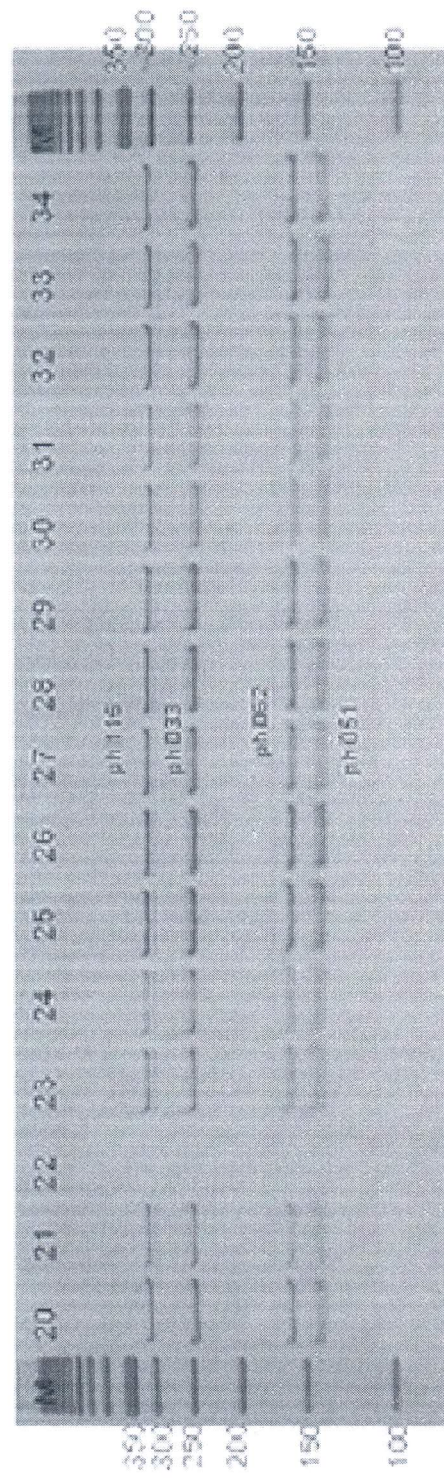


Figura 30. Continuación.

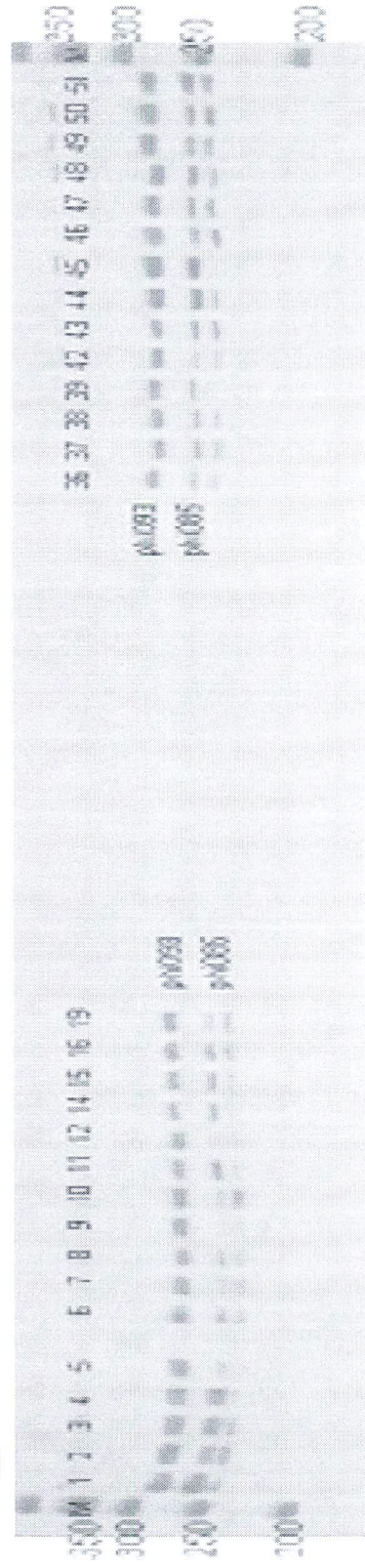


Figura 31. Perfil de bandeo obtenido en los loci phi093 y phi085 para las 175 variedades nativas de maíz azul.

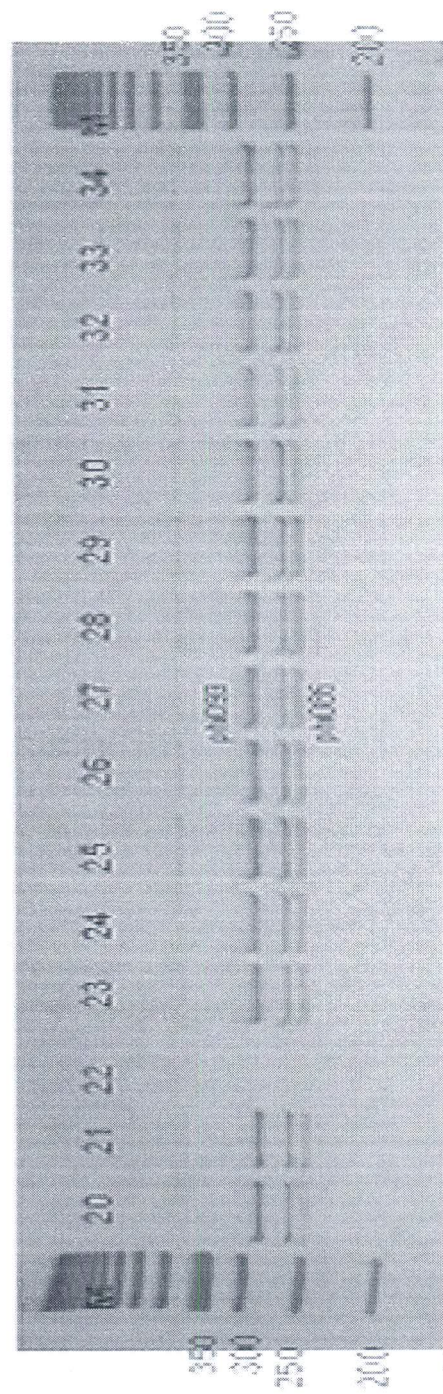
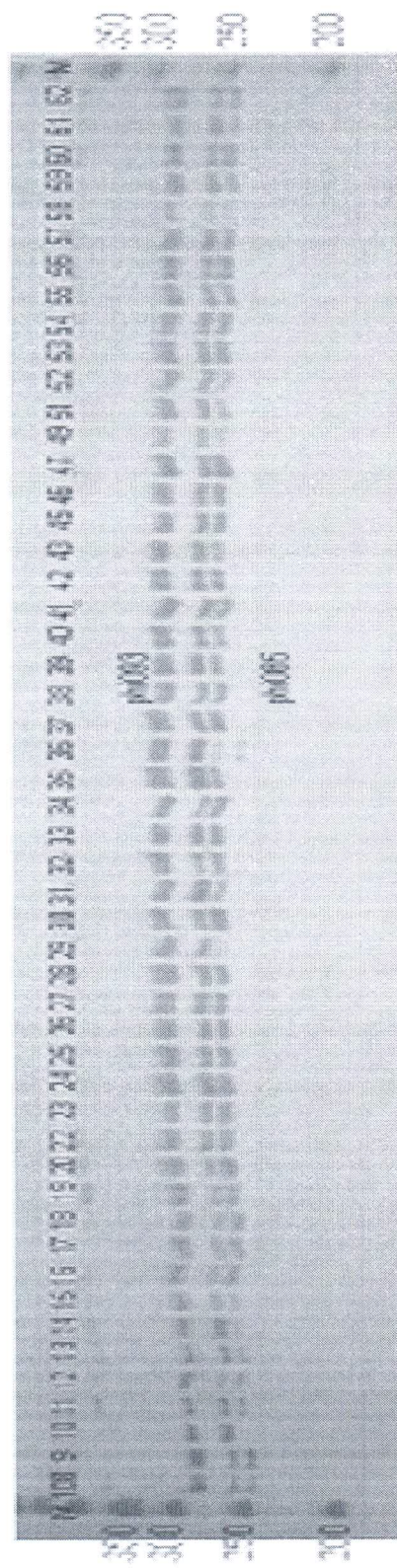
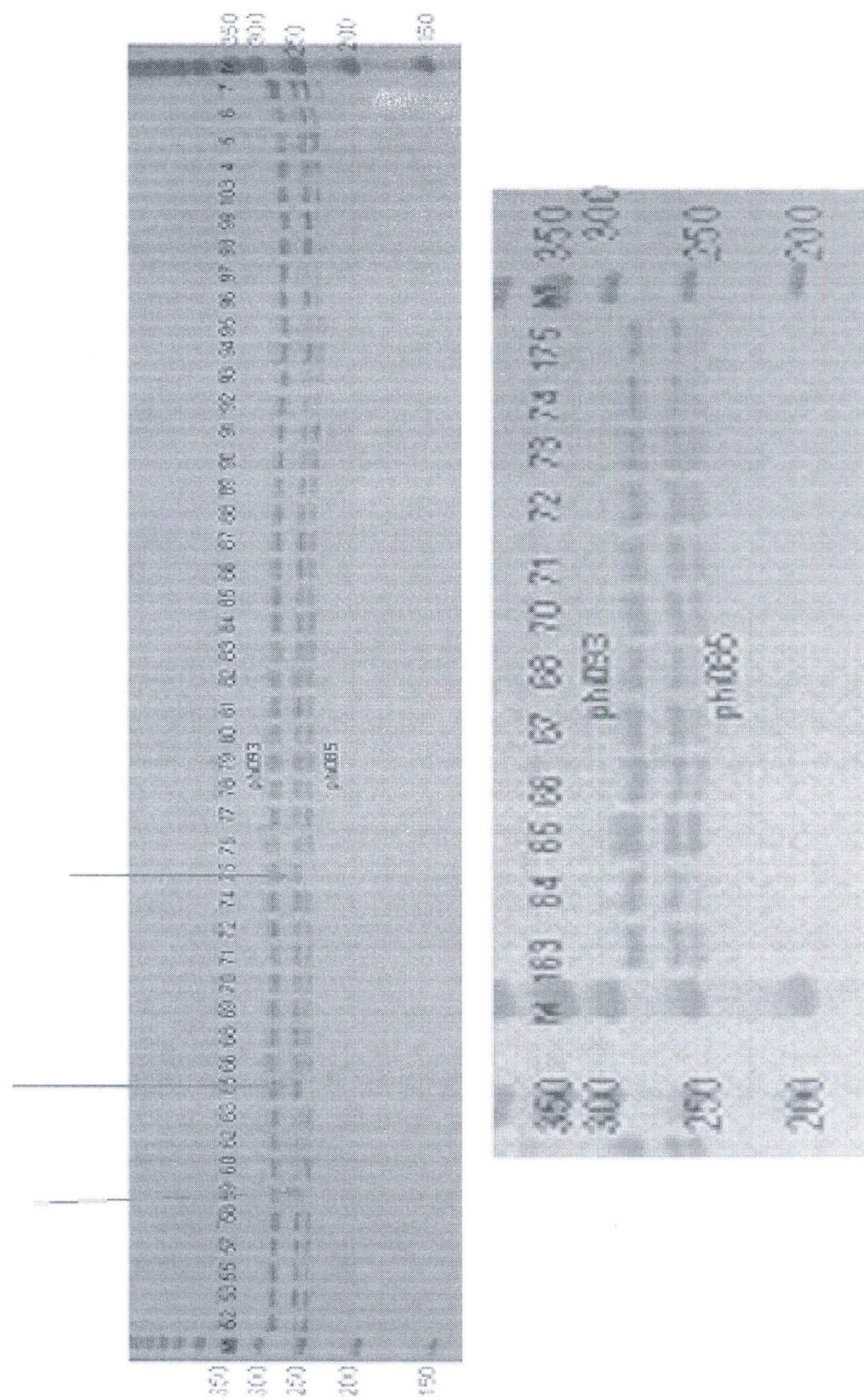


Figura 31. Continuación.



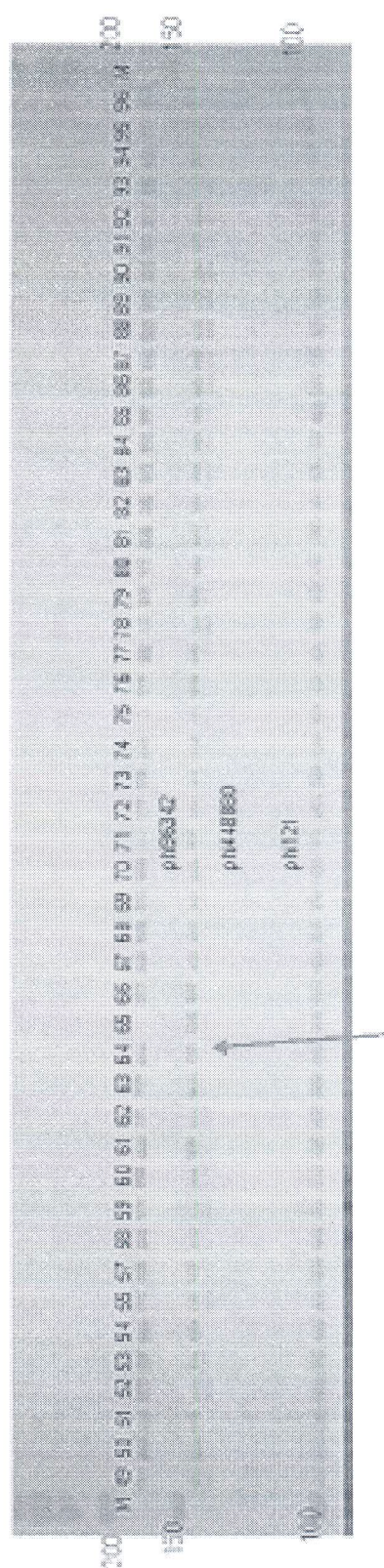
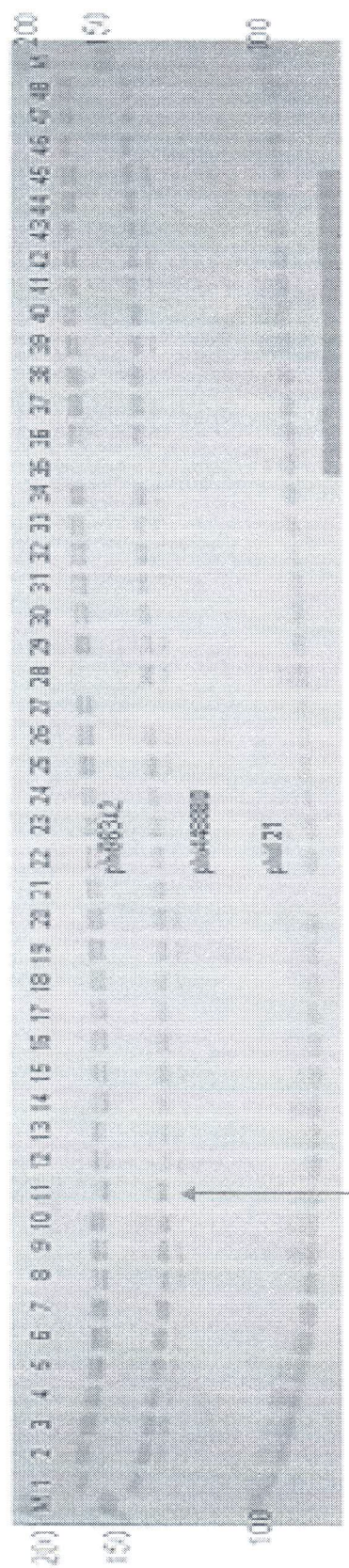


Figura 32. Perfil de bandeo obtenido en los loci phi196342, phi448880 y phi121 para las 175 variedades nativas de maíz azul. La flecha indica polimorfismo.

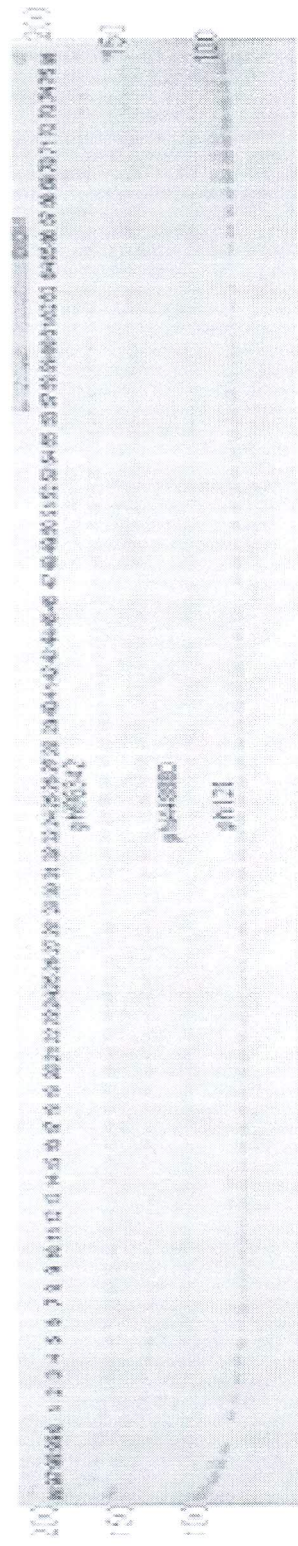


Figura 32. Continuación.

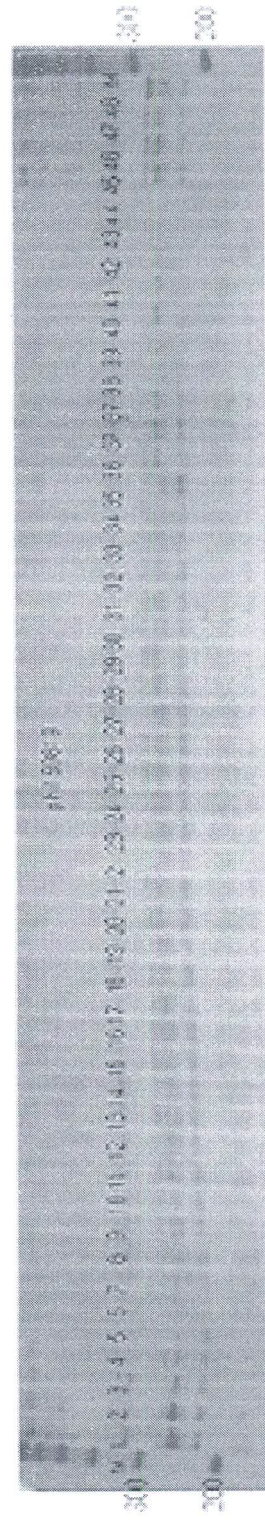


Figura 33. Perfil de bandeo obtenido en el locus phi159819 para las 175 variedades nativas de maíz azul.

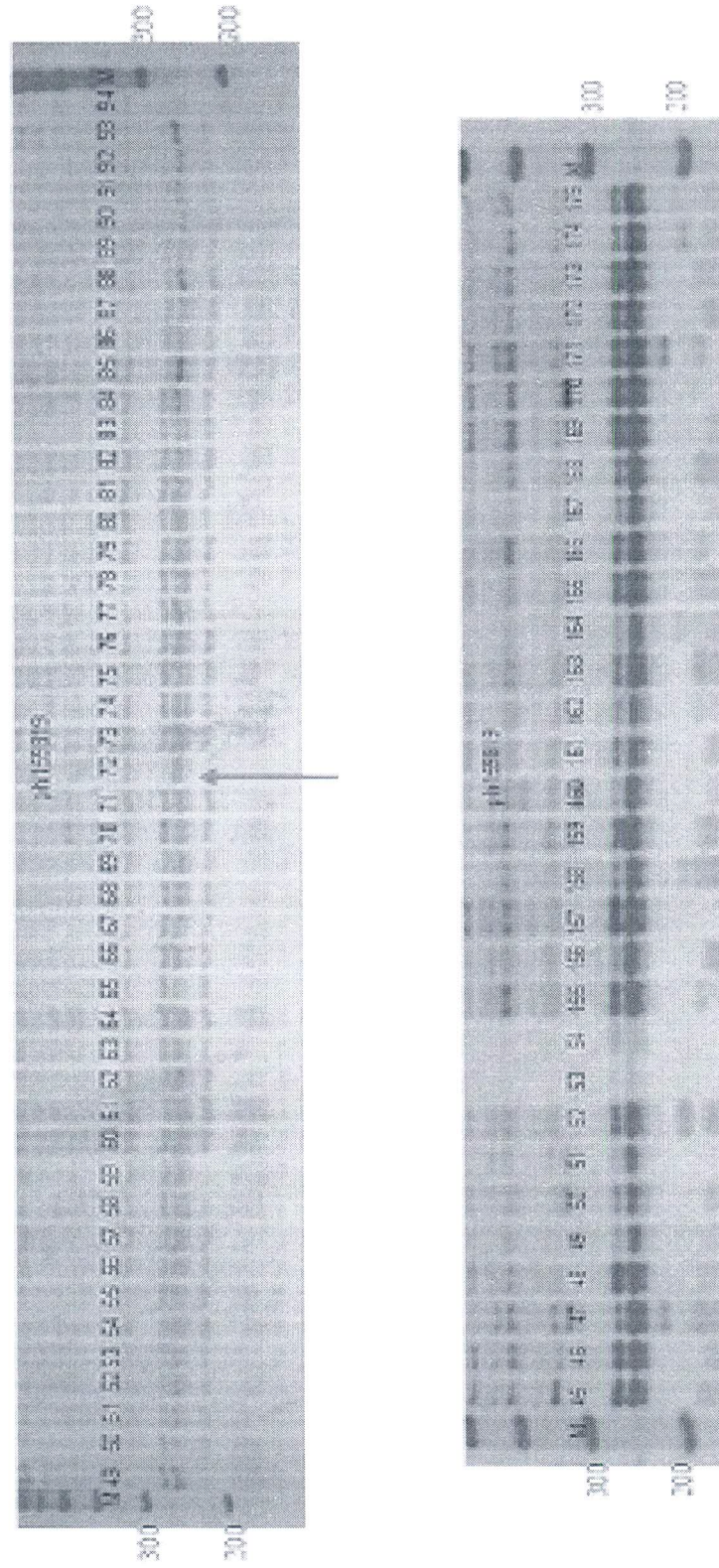


Figura 33. Continuación.

El contenido de información polimorfa (PIC), expresa el grado de polimorfismo que es capaz de detectar un determinado marcador molecular. El PIC estimado para los 10 *loci* SSR varió de 0.67 (phi448880) a 0.90 (phi085), con un promedio de 0.72 (Cuadro 11). Si un marcador SSR presentara un PIC relativamente bajo, esto indicaría un escaso número de alelos detectados en ese locus en las muestras analizadas, como fue el caso del marcador phi121, que al resultar monomórfico, no se obtuvo un valor de PIC. Los resultados obtenidos ratifican la observación general de que a medida que aumenta el número de bandas observadas, se incrementa el índice de polimorfismo por marcador SSR. Los *loci* con mayor PIC se presentan como más informativos para detectar la variabilidad presente en el conjunto de muestras analizadas. Trabajos previos de identificación de líneas de maíz con SSR mostraron valores de PIC que oscilaron entre 0.41 a 0.90 (Beyene *et al.*, 2006) y de 0.33 a 0.89 (Vaz Patto *et al.*, 2004). Cabe aclarar que si bien en dichos trabajos el número de marcadores utilizado fue mayor, la cantidad de muestras analizadas fue menor al que se utilizó en el presente estudio. Por otra parte, Bantte y Prasanna (2003) en un trabajo de caracterización genotípica con SSR en líneas e híbridos de maíz, informaron valores promedio de 16 bandas por locus y valores de PIC entre 0.00 y 0.90, con un promedio de 0.65. En el caso del presente trabajo, donde la cantidad de muestras y de marcadores fue similar a la ensayada en ese estudio, se obtuvieron resultados coincidentes en cuanto al número de alelos promedio por locus.

La variabilidad genética presente en las variedades nativas es la razón por la que se presentan valores del PIC altos; estas poblaciones son de polinización

libre, formadas por plantas que presentan características de una alta heterocigocidad y variabilidad genética; al respecto, Nava *et al.* (2000) mencionan que dichas características se mantienen debido a que en cada nueva generación hay una recombinación de los genes; mientras que las líneas presentan un alto grado de parentesco lo que ocasiona un aumento de la endogamia por lo que su variación genotípica es reducida, por consiguiente el polimorfismo es menor y se obtienen bajos valores del PIC en la mayoría de sus *loci*.

La caracterización de un organismo puede realizarse mediante la descripción de un cierto número de atributos, pero la identificación requiere además que los caracteres sean propios y distintivos del organismo que se describe (Lu y Bernardo, 2001). Los patrones de bandeo apropiados para la identificación molecular mediante marcadores SSR, se obtuvieron considerando el número, tamaño y posición de las bandas. Las variedades criollas JJLR-626, JJLR-682, JJLR-686, JJLR-719, JJLR-727 y JJLR-338 presentaron patrones únicos para los 10 marcadores SSR, con la presencia de 17 bandas cada una. En cambio, las variedades JJLR-286, JJLR-390, Az01xProbador y Az13xProbador fueron diferenciadas sólo por la presencia de 3 y 9 bandas, respectivamente.

Los marcadores SSR utilizados fueron lo suficientemente polimórficos como para establecer patrones únicos que permitieron identificar a las muestras con relativamente pocos *loci*, es decir, aquéllas con algún patrón de bandeo presente sólo en una o algunas muestras y ausente en el resto, o con la combinación de distintos *loci* SSR.

A partir del análisis de la matriz binaria usando el programa NTSYS, se obtuvo como resultado final un dendograma que representa la similitud genética entre las distintas variedades nativas (Figura 34), indicando tanto la diversidad genética como el grado de parentesco que existe entre las muestras de maíz analizadas. Castañón *et al.* (1998), mencionan que la decisión sobre el número óptimo de agrupamientos es subjetiva, especialmente cuando se incrementa el número de materiales a agrupar, ya que si se seleccionan pocos, los grupos resultantes son heterogéneos, mientras que si se seleccionan demasiados, la interpretación de los mismos suele ser complicada. En el dendograma presentado en la Figura 31 a una distancia de similitud de 0.16 se definen 6 grupos, de acuerdo a su grado de parentesco. Puede observarse que las poblaciones no se agruparon de acuerdo con su origen geográfico. Así mismo, hay que considerar que la mayoría de estas variedades se han originado de una misma raza (Chalqueño) y han sido seleccionadas por alguna característica de interés agronómico, por lo que sería probable que con los marcadores SSR evaluados no se detectaron diferencias muy amplias, consecuentemente su patrón de bandas fue casi idéntico, lo que se refleja en su grado de similitud en el dendograma. Se puede considerar que en general, las variedades son bastante homogéneas, ya que la mayoría se localizan a una distancia inferior de 0.02 respecto al resto; sin embargo hay algunos materiales que se alejan como JJLR-648 y JJLR-650, los cuales se ubicaron a una distancia de similitud de 0.095.

A pesar de que existió discrepancia entre los agrupamientos realizados a partir de marcadores moleculares respecto a los obtenidos mediante análisis

morfológico, ambos agrupamientos fueron bastante deficientes, ya que la variación morfológica registrada para los caracteres evaluados no permitió separar adecuadamente las variedades; en el caso del análisis molecular, la situación fue similar, debido posiblemente a que los materiales evaluados compartieron alelos derivados de individuos relacionados, lo que forzó a estas poblaciones a agruparse muy estrechamente en vez de formar un grupo separado.

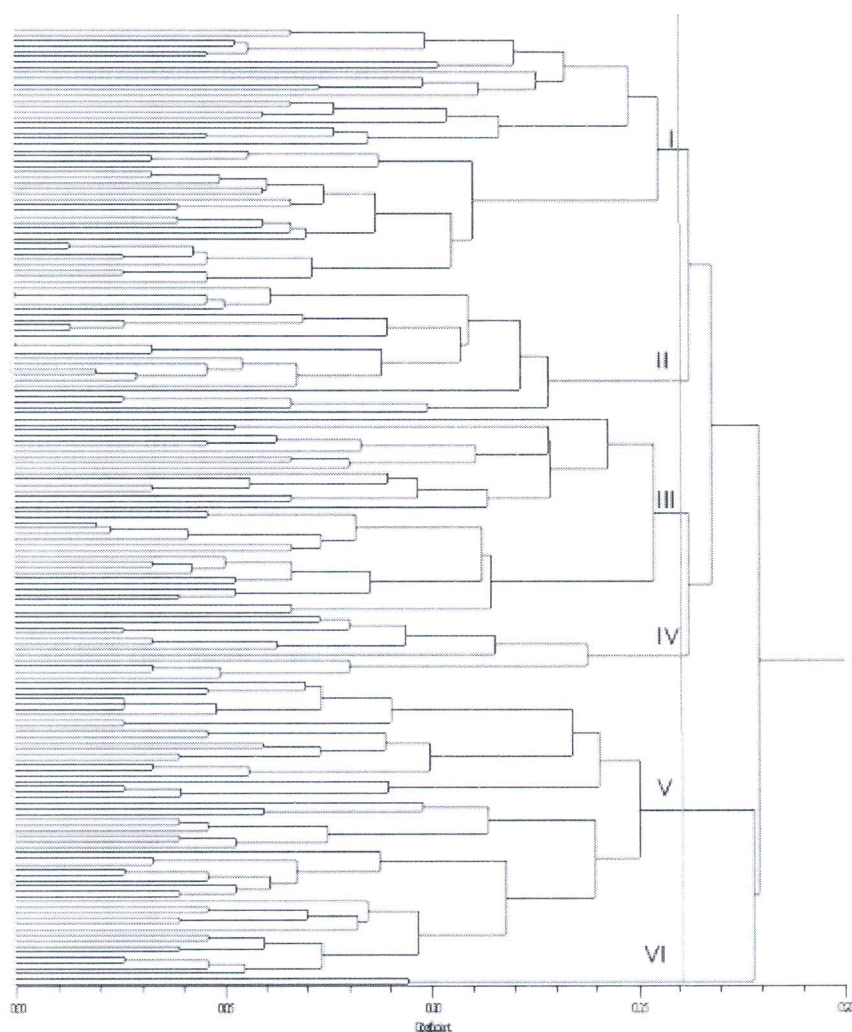


Figura 34. Dendrograma de agrupamiento y coeficiente de similitud genética obtenido a partir de SSR's en 175 variedades nativas de maíz azul.

selección y uso dentro de programas de mejoramiento genético, así como también en lo referente a la posibilidad de identificar duplicaciones de materiales. Esta herramienta ha sido utilizada por Bantte y Prasanna (2003), Lu y Bernardo (2001) y Vaz Patto *et al.* (2004), quienes concluyen recomendándola como la técnica molecular más efectiva para alcanzar los fines descritos anteriormente. En este trabajo, los resultados obtenidos indican que las similitudes fueron muy elevadas considerando que se trató de materiales colectados en muy diferentes localizaciones geográficas y generados bajo distinto manejo agronómico.

La extracción de DNA se convierte en un primer paso esencial en cualquier trabajo de caracterización que involucre usar la tecnología de marcadores moleculares; por tal razón, la selección y aplicación adecuada del método de extracción de DNA es de suma importancia para asegurar buena pureza y concentración. Al respecto Weising *et al.* (2005), mencionan que cada especie requiere ciertas modificaciones en la metodología de extracción a fin obtener DNA de calidad; en este sentido se puede decir que la metodología empleada con el aparato de extracción de DNA, funcionó excelentemente bien para el maíz. Esto fue evidente debido que en el presente estudio para cada muestra se obtuvo un volumen de 1000 μL , y la concentración de DNA varió de 70 a 150 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$; y de ese volumen, por muestra, se tomó una cantidad de 2.5 μL , con la cual se pudieron realizar cada una de las reacciones de PCR.

Las relaciones a nivel molecular entre variedades criollas de maíz azul no habían sido estudiadas con anterioridad a este trabajo. Sin embargo, es indudable que con la ayuda de técnicas biotecnológicas como el uso de

marcadores moleculares se puede facilitar y acortar los tiempos para realizar estudios que estimen la variabilidad genética existente dentro de este tipo de maíz, acelerando el proceso de identificación, selección y/o eliminación de genotipos dentro de programas de mejoramiento, entre otros usos.

Los métodos utilizados en este estudio (agronómicos y moleculares) indican la existencia de variabilidad genética entre las variedades nativas; pero es necesario hacer una clasificación en grupos con base en parámetros ambientales similares de acuerdo a su origen geográfico para reducir el tamaño de las muestras y efectuar la caracterización de la variabilidad de un menor número de materiales, con el propósito de tener una mayor referencia del grado de similitud genética existente entre los materiales de cada grupo. De igual forma, las diferencias y/o similitudes obtenidas en relación con los resultados del análisis morfológico pueden corroborarse realizando una caracterización agronómica más completa, como ya se mencionó anteriormente. Tanto en los análisis agronómicos como en los moleculares se encontraron diferencias entre las variedades nativas, pero en los resultados agronómicos hubo una mayor variabilidad. De manera general, los resultados agronómicos no concordaron con los obtenidos de los análisis moleculares, esta congruencia o incongruencia parcial (nunca total) entre los resultados de ambos análisis puede deberse según Crisci (1998) a la posible existencia de errores metodológicos en la obtención y análisis de datos. Por otra parte, la variabilidad detectada en los análisis agronómicos y moleculares, en todas las variedades nativas, se puede mencionar que pudo deberse a que los materiales fueron colectados de

diferentes regiones de los Valles Altos Centrales, y a pesar que se asemejan en ciertas características agronómicas, presentan variabilidad genética entre ellos. El uso de marcadores moleculares facilita el conocimiento de la variabilidad genética del maíz a nivel molecular, pero es necesario tener un punto de referencia para comparar los resultados obtenidos, y en este sentido los datos agronómicos son de vital importancia para tener una caracterización más completa de la diversidad genética presente en las variedades nativas de maíz azul.

Como una futura actividad práctica se sugiere que la combinación de los análisis moleculares y agronómicos se realice en un menor número de materiales, ya que se tendrían ventajas en los aspectos metodológico, logístico y, principalmente, en la interpretación y discusión de los resultados para realizar una mejor caracterización y selección de este tipo de variedades de maíz. Por otra parte, en este trabajo se emplearon 10 microsatélites; pero es importante utilizar un mayor número y distinta clase de marcadores SSR para contar con una mayor selección de aquéllos que sean más informativos de acuerdo a la calidad de sus productos amplificados, su localización en el genoma y el nivel de polimorfismo que detectan, y de esta manera disminuir la redundancias genéticas y caracterizar las variedades nativas más importantes para su uso en programas de mejoramiento genético.

Las variedades nativas son importantes como fuente de germoplasma indispensable en los programas de mejoramiento genético para Valles Altos Centrales de México, y de acuerdo con los resultados obtenidos se considera que si se cumplieron los objetivos planteados en este trabajo. La

caracterización agronómica permitió la identificación de variedades prometedoras con diferentes caracteres agronómicos; pero para que se consideren adecuadas para integrar un programa de fitomejoramiento es necesario incrementar el número de variables a estudiar y evaluar estos materiales en diversas localidades bajo diferentes condiciones ambientales y de manejo, controlando fechas de siembra, y de esta manera identificar variedades con mayor capacidad de rendimiento, que sean precoces y estables para una estación de crecimiento óptimo. También, se cumplió el objetivo de caracterización molecular por medio de microsatélites (SSR), la cual es de gran utilidad, ya que permitió detectar diferencias genéticas entre las variedades nativas y, además, se pudo observar el grado de parentesco entre éstas; aunque en futuros trabajos se recomienda la inclusión de un mayor número de marcadores SSR para obtener mejor caracterización y clasificación de estas poblaciones. La hipótesis propuesta sí se pudo comprobar, debido a que la información agronómica y molecular fueron complementarias para este estudio y se pudo identificar variedades que no serían útiles en programas de mejoramiento genético, ya que no sobresalieron en ninguna variable agronómica.

VI. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos y de acuerdo a las condiciones y métodos experimentales descritos en el presente trabajo en la caracterización agronómica y molecular de las 175 variedades nativas de maíz azul, se desprenden las siguientes conclusiones:

Tanto en la caracterización agronómica como en la molecular se observó variabilidad genética en todas las variedades utilizadas en este estudio.

Ninguna variedad demostró superioridad agronómica para todas las variables evaluadas, lo que hubiera representado un buen ajuste de su condición genotípica y fenotípica en respuesta a las condiciones ambientales del sitio de evaluación.

Los testigos mostraron un comportamiento intermedio y fueron superados por una gran parte de las variedades nativas en todas las variables evaluadas.

Es importante que la caracterización agronómica se lleve a cabo en varias localidades con diferentes condiciones ambientales y de manejo, para poder

realizar una mejor selección de los materiales de acuerdo con el grado de adaptabilidad que muestren.

La técnica de microsatélites (SSR) resulta rápida y simple para caracterizar variedades nativas, permitiendo su identificación y agrupamiento con base en su similitud genética.

Los SSR utilizados permitieron detectar polimorfismo de alelos en 10 *loci* específicos para cada una de las muestras evaluadas

Las diferencias alélicas detectadas estuvieron relacionadas con el tipo de microsatélite utilizado, pero también debe considerarse que las mutaciones, como deleciones o inserciones, están involucradas en la generación de polimorfismo, así como el grado de homocigocis de las variedades nativas.

La caracterización molecular y la agronómica, deben funcionar como complemento una de la otra, para establecer programas de mejoramiento genético con variedades nativas de maíz azul.

VII. LITERATURA CITADA

- Agama A., E., M. A. Ottenhof, I. A. Farhat, O. Paredes-López, J. Ortiz-Cereceres, L. A. Bello. 2005. Aislamiento y caracterización del almidón de maíces pigmentados. *Agrociencia* 39: 419-429.
- Albani, M. C. and M. J. Wilkinson. 1998. Simple sequence repeat polymerase chain reaction for the detection of somaclonal variation. *Plant Breeding* 117: 537-575.
- Allard, R. W. 1975. Principios de la mejora genética en plantas. 2ª. Edición. Ed. Omega. Barcelona, España. 498 p.
- Álvarez C., N. M. 2004. Uso y manejo tradicional de los maíces criollos en la región Iztaccíhuatl-Popocatepetl del estado de Puebla. Tesis de Maestría. Programa en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional. Campus Puebla. Colegio de Postgraduados. Puebla, Puebla, México.
- Alves, M. F., B. Ramos, M. A. García-Sánchez, A. P. Eslava and J. M. Díaz-Minguez. 2002. A DNA-based procedure for in plant detection of *Fusarium oxysporium* f. sp. Phaseoli. *Phytopathology* 92: 237-244.
- Antuna G., O., F. Rincón S., E. Gutiérrez R., N. A. Ruíz T. y L. Bustamante G. 2003. Componentes genéticos de caracteres agronómicos y de calidad fisiológica de semillas en líneas de maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana* 26: 11-17.
- Arellano V., J. L. 2006. Innovaciones Tecnológicas 2005: Para mejorar la competitividad y sostenibilidad de las cadenas agroalimentarias y agroindustriales. Folleto Técnico No. 4. INIFAP, SAGARPA. pp: 31-34.

- Arellano V., J. L., C. Tut, A. Maria, Y. Salinas y O. R. Taboada. 2003. Maíz azul de los Valles Altos de México. I. Rendimiento de grano y caracteres agronómicos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 26: 101-107.
- Arreguin M., J. D. 2002. Evaluación de maíces pigmentados y blancos con potencial elotero. Tesis Profesional. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. México. 68 p.
- Ballardo P., A. y T. V. Gómez. 1998. Ensayo de variedades precoces de maíz bajo condiciones de temporal en Tepames, Colima. *Revista Chapingo* 1: 5-8.
- Bantte, K. and B. M. Prasanna. 2003. Simple sequence repeat polymorphism in Quality Protein Maize (QPM) lines. *Euphytica* 129: 337-344.
- Bassini, A. 1976. Barley cultivar identification by use of isoenzyme electrophoretic patterns. *Canadian Journal Plant Science* 56: 1-6.
- Becerra V., V. y C. M. Paredes. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica de Chile* 60(3): 270-281.
- Bello L., A. 2006. La nutrición del maíz azul. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional. México. 6 p.
- Beyene, Y., A. M. Botha and A. Myburg. 2006. Genetic diversity among traditional Ethiopian highland maize accessions assessed by simple sequence repeat (SSR) markers. *Genetic Research and Crop Evolution* 53: 1579-1588.
- Bhat, K. W., S. Lakhanpaul, K. P. S. Chandel and R. L. Jarret. 1995. Molecular marker for characterization and identification of genetic resources of perennial crops. In: *Molecular genetic techniques for plant genetic resources*. Report of an IPGRI workshop 9-11. Rome, Italy. pp: 107-118.
- Brauer H., O. 1980. *Fitogenética Aplicada*. Ed. Limusa. México. pp: 51-80.
- Bretting, P. and K. Widrlechner. 1995. Genetic markers and horticultural germoplasma management. *Horticulture Science* 30(7): 1349-1355.

- Bridge, P. D. and D. K. Arora. 1998. PCR for species definition. In: Application of PCR *In: Mycology*. Bridge, P. D., D. K. Arora, C. A. Reddy and R. P. Elander (eds.). CABI Publishing. Wallingford, Oxfordshire, United Kingdom. 265 p.
- Bucio A., 1966. Enviroment and genotype-enviromental components of variability in inbred lines. *Heredity* 21: 387-397.
- Casey, R., C. Domoney and N. Ellis. 1986. Legume storage proteins and their genes. *Oxford Surveys. Plant Molecular Cell Biology* 3: 1-25.
- Castañón G., H. Tosquy, R. Arano y B. Raygoza. 1998. Análisis cluster en híbridos y sintéticos de maíz de temporal en Veracruz, México. *Agronomía_Mesoamericana* 9(2): 77-81.
- Carballo C., A. 1995. Descripción varietal. Apuntes para el curso de Producción de Semillas I. Programa Interdisciplinario de Producción de Semillas. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
- Carballo C., A. y F. Márquez. 1970. comparación de variedades de maíz del Bajío y la Mesa Central por su rendimiento y estabilidad. *Agrociencia* 5(1): 129-146.
- Castillo G., F. 1993. La variabilidad genética y el mejoramiento de los cultivos. *In: Ciencia. Revista de la Academia de la investigación científica. México. No. especial. pp: 69-79.*
- Castillo T., R. O. 1996. La biotecnología en la conservación y usos de la agro-diversidad. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INAP), Chile. 6: 5-17.
- CIMMYT, 2006. Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. 3ª. Edición. México, D. F.: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. 98 p.
- Coe, E. H. 1985. Corn and corn improvement. Phenotypes in corn: control of pathways by alleles, time and place. In: *Maize Freeling*. pp: 509-521.

- Coe, E. H., D. L. Thomson and V. Walvot. 1988. The fenotypes mediated by the iojap genotype in maize. *American Journal Botany* 75: 634-644.
- Cortés J., E. 2000. Evaluación de variedades criollas de maíz en una zona de transición de la sierra sur de Oaxaca. Tesis Profesional. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. México. 50 p.
- Crisci, J. V. 1998. La sistemática de nuestro tiempo: Hechos, problemas y orientaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 63: 21-32.
- Crisci, J. V. y J. J. Morrone. 1995. Morfología, moléculas y la historia de la vida: de ortodoxias y herejías. *Innovación y Ciencia* 4(1): 58-63.
- Cruz M., R. 1989. Un ejemplo de la prueba exacta de los parámetros de estabilidad de Ebarhart y Russell. *Revista Fitotecnia. Mexicana*. 12: 147-155.
- De Loose, M. and G. Gheysen. 1995. Identification methods base don molecular techniques. *International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Working Group on Biochemical an Molecular Techniques and DNA-profiling in Particular. Third Sesion. Wageningen, Netherlands*. 67 p.
- De Viene, D. 2003. Molecular markers in plant genetics and biotechnology. Science Publisher, Inc. INRA. 235 p.
- Dickerson. G. W. 1990. Blue corn production and marking New Mexico. *Cooperation Extension Service Guide H-226*. p 24.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 12-14.
- Durán R., J. y J. Sahagún. 1992. La interacción genético-ambiental en la genotecnia vegetal. *Rev. Chapingo* 78: 13-16.
- Eberhart, S. A. and W. A. Russell. 1966. Stability of parameters for comparing varieties. *Crop Science* 6: 36-40.
- Espinosa G., B. M. 2003. Antocianinas en maíces de grano pigmentado y medición de su actividad antioxidante. Tesis Profesional. Departamento de

- Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. México. 69 p.
- Erlich, H. A. and N. Rnaheim. 1992. Genetic analysis using the polimerase chain reaction. *Annual Review of Genetic* 26: 479-506.
- Fang, D. Q. and M. L. Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with intersimple sequence repeat markers. *Theoretical Applied Genetics* 95: 408-417.
- Ferreira, M. E. and D. Grattapaglia. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia, Brasil. (abstract).
- Fischer, K.S., G. O. Edmeades and E. C. Johnson. 1987. Recurrent selection for reduced tassel branch number and reduced leaf area density above the ear in tropical maize populations. *Crop Science* 27: 227-243.
- Fugang, R., B. Lu, S. Li, J. Huang and Y. Zhu. 2003. A comparative study of genetic relationships among the AA-genome *Oryza* species using RAPD and SSR markers. *Theoretical Applied Genetics* 108: 113- 120.
- García E., 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köepen. Instituto de Geografía. UNAM. México. 217 p.
- Gayler, K. R. and G. E. Sykes. 1985. Effect of nutritional stress on the storage proteins of soybeans. *Plant Physiology* 78: 582-585.
- Gepts, P., y F. A. Bliss. 1986. Phaseolin protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple and centers of domestication. *Economy Botany*. 40: 451-468.
- Giagnoni, A. M. 2005. Efecto de la densidad de plantas, en dos espaciamientos entre hileras, en el comportamiento de líneas puras de maíz. Tesis Maestría. Facultad de Agronomía e ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. 45 p.
- González de León D., D. Hoisington, C. Jiang and M. Khairallah. 1995. Molecular marker applications to plant breeding, workshop offered by the applied molecular genetics laboratory. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). El Batán, México. 38 p.

- Guemes V., N., A. D. Hernández, M. I. Reyes, E. N. Aquino, M. E. Espíndola, G. Dávila y S. Mercado. 2002. Caracterización física, química y estructural de 3 variedades de elotes de color de la región del Valle de Tulancingo, Hidalgo. Instituto de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, México. 7 p.
- Gutiérrez R., E., A. Espinoza B., A. Palomo G., J. J. Lozano G. y O. Antuna G. 2004. Aptitud combinatoria de híbridos de maíz para la Comarca Lagunera. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27: 7-11.
- Gepts, P. 1990. Biochemical evidence bearing in the domestication of *Phaseolus* (Fabaceae) bean. *Economy Botany*. 44: 28-38.
- Hallauer, A. R. 2001. Speciality corns. 2a. Edition. pp: 294-296.
- Henry, D. 1998. Practical applications of molecular markers to tropical and subtropical species. *Acta Horticulture* 461: 107-111.
- Hernández X., E. 1981. Maize and man in the Great Southwest. *Economy Botany* 39(4): 416-430.
- Herrera C., B. E. 1999. Diversidad genética y valor agronómico entre poblaciones de maíz de la raza Chalqueño. Tesis Doctoral. Genética. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 116 p.
- Herrera C., B. E., F. Castillo, J. J. Sánchez, J. M. Hernández, R. Ortega y M. Major. 2004. Diversidad del maíz chalqueño. *Agrociencia* 38: 191-206.
- Hidalgo R., C. 2003. Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. *In* : Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos filogenéticos. Hidalgo R. y T. L. Franco (eds.). Boletín Técnico No. 8. IPGRI. Cali, Colombia. pp: 2-26.
- Hrjove, S., I. Pejic, M. Baric and V. Kozumplik. 2007. Originality of M3S maize population and changes in allele frequencies revealed by SSR markers after two cycles of selfed progeny recurrent selection. *Euphytica* 161: 67-73.
- Johnson, D. L. and M. N. Croissant. 1993. Blue Corn. Colorado State University. Colorado, USA. 28 p.

- Johnson, D. E. 2000. Métodos multivariados aplicados al análisis de datos. Internacional Thomson Editores. México. pp: 93-123.
- Jones, E. S., H. Sullivan, D. Bhatramakki and J. S. C. Smith. 2007. A comparación of simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism marker technologies for the genotypic análisis of Maize (*Zea mays* L.). *Theoretical Applied Genetics* 115: 570-579.
- Jugenheimer, R. W. 1988. Maíz, variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semillas. Ed. Trillas. pp: 84-91.
- Karp, A., S. Kresovich, K. V. Bhat, W. G. Ayad and Hodgkin T. 1997. Molecular tools. *In*: Plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Bulletin 2. 47 p.
- Kazan, K., F. J. Muehlbaver, N. F. Weeden and G. Ladizinsky. 1993. Inheritance and linkage relationships of morphological and isozyme loci in chick-pea (*Cicer arietinum* L.) *Theoretical Applied Genetics* 86: 417-426.
- Kiniry, J.R. and D. P. Knieval. 1995. Response of maize seed number to solar radiation intercepted soon after anthesis. *Agronomy Journal* 87: 228-234.
- Kojima, T., T. Nagaoka, K. Noda and Y. Ogihara. 1998. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in einkors wheat in relation to that of RFLP markers. *Theoretical Applied. Genetics* 96: 37-45.
- LaRosa, R., A. Angiolillo, C. Guerrero, M. Pellegrini, L. Rallo, G. Besnard, A. Bervill and A. Martin. 2003. A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers. *Theoretical Applied Genetics*. 106: 1273-1282.
- Leonard, A., C. Damerval and D. De Vienne. 1988. Organ-specific variability and inheritance of maize proteins revealed by two dimentional electrophoresis. *Genetic Research* 52: 97-103.
- López-Herrera, A. 1975. Fechas de siembra en valles altos para comprobar la relación de la coloración del grano de maíz con la precocidad y la producción. Tesis Profesional. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. México. 85 p.

- López S., J. A., C. A. Reyes M., S. Castro N. y F. Briones E. 2004. Componentes del crecimiento de granos de cultivares prolíficos de maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27: 23-26.
- López-Reynoso, J. J. 2007. Apuntes de Genotecnia. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp: 33-37.
- Lu, H., y R. Bernardo 2001. Molecular marker diversity among current and historical maize inbreds. *Theoretical Applied Genetics* 103, 613-617.
- Luna M., M. 1992. Efecto de la fertilización en 10 variedades criollas de maíz (*Zea mays* L.) en Huauchinango, Puebla. *In: Memoria del XIV Congreso Nacional de Fitogenética*. SOMEFI. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 551 p.
- Luna F., M. y J. R. Gutiérrez. 2000. Investigación fisiotécnica de temporal en la región alta del norte de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 23: 195-210.
- Luna P., A. 2008. Diferenciación genómica de semillas y cladodios de *Opuntia* spp., y su posible uso para diferenciación. Tesis Doctoral. Instituto de Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 128 p.
- Macaulay, L. Ramsay, W. Powell and R. Waugh. 2001. A representative, highly informative 'genotyping set' of barley SSRs. *Theoretical Applied Genetics* 102: 801-809.
- Maltros, R. H., J. L. Ibave, P. Bustillos y R. I. Díaz de la G. 1999. Industrialización del maíz como fuente de pigmentos para la industria alimentaria, farmacéutica y de cosméticos. *In: Segundo Taller Nacional de Especialidades de Maíz*. Espinoza, J. y J. del Bosque (eds.). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. pp: 35-57.
- Martin, R. R., J. Delano and C. A. Levesque. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annual Review Phytopathology*. 38: 207-239.
- Martínez B., F. y J. J. Zazueta. 2003. Extrusión de maíz (*Zea mays* L.) azul con adición de hidróxido de calcio: alternativa para la obtención de productos

- expandidos. Universidad Autónoma de Querétaro/CINVESTAV-Querétaro. CICATA-Querétaro. 7 p.
- Maughan, P. J., A. Bonifacio, E. N. Jellen, M. R. Stevens, C. E. Coleman, M. Ricks, S. L. Mason, D. E. Jarvis, B. W. Gardunia and D. J. Fairbanks. 2004. A genetic linkage map of quinoa (*Chenopodium quinoa*) based on AFLP, RAPD and SSR markers. *Theoretical Applied Genetics* 109: 118-1195.
- Meachman, D. K., D. D. Kasarda and C. O. Quaiet. 1978. Genetic aspects of wheat gliadin proteins. *Biochemistry Genetic* 16: 813-853.
- Mejía C., J. A. 1986. Evaluación de maíces criollos de temporal en el estado de Yucatán. Tesis Profesional. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. México. 75 p.
- Miguel A., M. 2003. Variedades criollas de maíz azul raza Chalqueño: características agronómicas, rendimiento de grano y calidad de semilla. Tesis Doctoral. Producción de Semillas. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. México. 97 p.
- Miguel A., M., J. L. Arellano, G. García, S. Miranda, A. Mejía y F. González. 2004. Variedades criollas de maíz azul para raza Chalqueño. Características agronómicas y calidad de semilla. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27: 9-15.
- Moeller, D. A. and B. A. Schaal. 1999. Genetic relationships among native american maize accessions of the great plains assessed by RAPD's. *Theoretical Applied Genetics* 99: 1061-1067.
- Moreno A., M. 2005. Calidad de proteína en maíces criollos (azules y cacahuacintles) y variedades mejoradas. Tesis Profesional. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. México. 72 p.
- Mullis, K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262: 43-46.

- Muñoz G., R. 1997. Evaluación de 36 variedades criollas de maíz (*Zea mays* L.) colectadas en las partes bajas del estado de Nuevo León. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Estudios Superiores Monterrey (ITESM). Monterrey, Nuevo León, México. 97 p.
- Muñoz A., G. 1983. Descripción varietal en arroz (*Oryza sativa* L.). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 90 p.
- Nava P., F., J. A. Mejía C., F. Castillo G. y J. D. Molina G. 2000. Evaluación de maíces precoces e intermedios en Valles Altos Centrales de México. I. Poblaciones sobresalientes. *Revista Fitotecnia Mexicana* 23: 119-128.
- Nebo, E., A. Beiles, N. Storch, H. Doll and B. Andersen. 1983. Microgeographic edaphic differentiation in hordein polymorphisms of wild barley. *Theoretical Applied Genetics* 64: 123-132.
- Ortega P., R., J. Sánchez, F. Castillo y J. M. Hernández. 1991. Estado actual de los estudios sobre maíces nativos de México. *In: Avances en el estudio de los recursos filogenéticos de México*. Ortega, P. R., G. Palomino, F. Castillo, V. A. González y M. Livera (eds.). Sociedad Mexicana de Fitogenética (SOMEFI). México. pp: 161-196.
- Paredes, M. and P. Gepts. 1995. Extensive introgression of middle american germplasm into chilean common bean. *Genetic Research and Crop Evolution* 42: 29-41.
- Plascencia G., G. 1998. Comportamiento de maíz pigmentado en la elaboración de frituras empleando el método de nixtamalización tradicional y de harina instantánea preparada por un proceso hidrotérmico. Tesis Profesional. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. México. 110 p.
- Poey, F. 1980. La pureza y la multiplicación inicial de semilla mejorada. *En: Primer curso de producción de semilla genética y básica*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 99 p.
- Pohelman, J. L. 1985. Mejoramiento genético de las cosechas. Ed. Limusa. México. pp: 285-290.

- Rafalski, J. A. and S. V. Tinguey. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPD's, microsatellites and machines. *Theoretical Applied Genetics* 85: 275-279.
- Rangel M., E., A. Muñoz, G. Vásquez, J. Cuevas, J. Merino y S. Miranda. 2004. Nixtamalización, elaboración y calidad de tortilla de maíces de Ecatlán, Puebla, México. *Agrociencia* 38: 53-61.
- Rajora, D. and M. H. Rahman. 2002. Microsatellite DNA and RAPD fingerprinting identification and genetic relationships of *Irbid poplar* (*Populus x canadiensis*) cultivars. *Theoretical Applied Genetics* 106: 470-477.
- Riaz, S., G. S. Dangl, K. J. Edwards and C. P. Meredith. 2004. A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. *Theoretical Applied Genetics* 108: 864-872.
- Rolhf, J. F. 1993. NTSYS pc. Numerical taxonomic and multivariate analysis system. Version 2.02. User's guide. Department of Ecology and Evolution. State University of New York. 45 p.
- Romero P., J. 2002. Diversidad genética y heterosis en cruas de poblaciones nativas de maíz de la raza chalqueño en los valles altos centrales de México. Tesis Doctoral. Genética. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. México. 97 p.
- Romero P., J. y A. Muñoz. 1996. Patrón varietal y selección de variedades de maíz para los sistemas agrícolas en la región de tierra caliente. *Agrociencia* 30: 63-73.
- Sahagún C., J. 1992a. El ambiente, el genotipo y su interacción. *Revista Chapingo* 79: 5-11.
- Sahagún C., J. 1992b. Consideraciones preliminares sobre la evaluación genotípica en series de experimentos conducidos en invernadero. *Revista Chapingo* 79: 26-31.
- Salas S., G. 2003. Caracterización de extractos de antocianinas obtenidos del grano de maíz (*Zea mays* L.). Tesis Profesional. Departamento de

- Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. México. 66 p.
- Salinas, M. Y. 2000. Antocianinas en el grano de maíces criollos mexicanos. Tesis Doctoral. Fisiología Vegetal. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. México. 118 p.
- Salinas M., Y., F. Martínez, M. Soto, R. Ortega y J. L. Arellano. 2003. Efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados. *Agrociencia* 37: 617-628.
- Salinas M., Y., M. Soto, F. Martínez, V. González y R. Ortega. 1999. Análisis de antocianinas en maíces de grano azul y rojo provenientes de cuatro razas. *Revista Fitotecnia Mexicana* 22: 161-174.
- Santacruz V., A., 2001. Genetic diversity of north american popcorn and its relationship with mexican and south american popcorns. Thesis Doctor of Philosophy. Iowa State University. Ames, Iowa, USA. 325 p.
- Saunders, J. A., S. Mischke, E. A. Leamy, A. Hemeida and C. Lanaud. 2002. Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao*. 12 p.
- Seminario C., J. F. 1991. Caracterización de la colecta de maíz (*Zea mays* L.) México 5 de la raza palomero toluqueño. Tesis de Maestría. Centro de Botánica. Colegio de Postgraduados. Chapingo, Estado de México. México. 114 p.
- Shoper, J. B., R. J. Lambert and B. L. Vasilas. 1986. Maize pollen viability and ear receptivity under water and high temperatures stress. *Crop Science* 26: 1029-1033.
- Silva C., E. G. 1992. Estudio agronómico y taxonómico de colecciones de la raza de maíz Cónico, y su colección central y perspectivas de uso en mejoramiento genético. Tesis de Maestría. Centro de Genética. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. México. 79 p.

- Smith, J. S. C., E. C. L. Chin, Smith, O. S., S. J. Wall, M. L. Senior, S. E. Mitchell, S. Krosovich and J. Ziegle. 1997. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theoretical Applied Genetic* 95: 163-173.
- Somers, D. J., P. Isaac and K. Edwards. 2004. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical Applied Genetics* 109: 1105-1114.
- Statistical Analysis System (SAS) User's guide. 1999. Versión 8. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Sun, G. L., M. William, J. Liu, K. J. Kasha and K. P. Pauls. 2001. Microsatellite and RAPD polymorphisms in Ontario corn hybrids are related to the commercial sources and maturity ratings. *Molecular Breeding* 7: 13-24.
- Systma, K. J. 1990. DNA and morphology: inference of plant phylogeny. *Tree* 5(4): 104-110.
- Taboada G., O. R. 1996. Diversidad de los maíces criollos en el valle de Serdán, Puebla. Tesis Profesional. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. México. 90 p.
- Taboada G., O. R. 2000. Patrón varietal de los maíces del valle de Serdán, Puebla. Tesis de Maestría. Genética. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. México. 85 p.
- Tanaka, A. y T. Yamaguchi. 1983. Producción de materia seca, componentes del rendimiento y rendimiento del grano de maíz. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 124 p.
- Tanksley, S. D. and T. J. Orton. 1983. Isozyme in Plant Genetics and Breeding. Amsterdam, Netherlands. Elsevier Science. (abstract).
- Tanksley, S. D. and C. Rick. 1980. Isozyme gene linkage map of the tomato: application in genetics and breeding. *Theoretical Applied Genetics* 57: 161-170.

- Tanksley, S. D. and T. J. Orton. 1983. Isozyme in Plant Genetics and Breeding. Amsterdam, Netherlands. Elsevier Science. (abstract).
- Tanksley, S. D., N. D. Young, A. H. Paleson y M. W. Boniezbball. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tool for an old science. *Biotechnology* 7: 251-265.
- Tapia C., E. 2007. Caracterización de germoplasma de cítricos mediante marcadores morfológicos y moleculares. Tesis Doctoral. Fruticultura. Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México, México. 98 p.
- Tinoco P., B. y C. Rojas G. 2006. Obtención de películas biopolimérica flexibles con acción antioxidante a partir de harina de maíz azul. Departamento de Tecnología de Alimentos-Centro de Biotecnología. Campus Monterrey. Instituto Tecnológico de Estudios Superiores Monterrey. Monterrey, Nuevo León, México. 5 p.
- Valadez M., E. y G. Kahl. 2005. Huellas de DNA en genomas de plantas. Teoría y protocolos de laboratorio. Ed. Mundiprensa. México. 147 p.
- Valadez M., E. 2006. Taller Internacional sobre Análisis Genómico de Plantas y Hongos Fitopatógenos. Departamento de Fitotecnica. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- Valverde M., E. y O. Paredes-López. 1996. El uso de marcadores moleculares en el estudio de la biodiversidad, el caso de hongos. *Ciencia y Desarrollo* 22: 28-37.
- Vaz Patto, M. C., Z. Satovicz, S. P'ego and P. Fevereiro. 2004. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. *Euphytica* 137: 63-72.
- Victores E., M. N. 2001. La producción, transformación y comercialización de maíz azul (*Zea mays* L.) en la zona nororiente del Estado de México y sus perspectivas. Tesis Profesional. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. México. 71 p.

- Warburton, M. L., X. Xianchun, J. Crossa, J. Franco, A. E. Melchinger, M. Frisch, M. Bohn and D. Hoisington. 2002. Genetic characterisation of CIMMYT inbred maize lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods. *Crop Science* 42: 1832-1840.
- Wehling, P., S. Stohn and G. Wricke. 1985. Chromosomal location of esterase, peroxidase and phosphoglucomutase isozyme structural genes in cultivated rye (*secale cereale* L.). *Theoretical Applied Genetics* 70: 477-482.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff and G. Kahl. 2005. DNA Fingerprinting in Plants. Principles, Methods and Applications. Second edition. Taylor & Francis Group. Boca Raton, Florida, USA. 298 p.
- Wellhausen, E. J., L. M. Roberts y E. Hernández X. En colaboración con P. C. Mangelsdorf. 1951. Razas de maíz en México. Folleto técnico No. 5. Oficina de Estudios Especiales. Secretaria de Agricultura y Ganadería. México.
- White, T. J. 1996. The future of PCR technology diversification of technologies and applications. *Tibtechnology*. 14: 478-483.
- Wilson, C. M. 1985. Mapping of zein polypeptides after isoelectric focusing on agarose gels. *Biochemistry Genetic* 23: 115-124.
- Winter, R. and G. Kahl. 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. *Word Journal Microbiology Biotechnology* 11: 438-448.
- Yan, Z., C. Dennebomm, A. Hattendorf, O. Dolstra, T. Debener, P. Stam and P. B. Visser. 2005. Construction of an integrated map of rose with AFLP, SSR, PK, RGA, RFLP, SCAR and morphological markers. *Theoretical Applied Genetics* 110: 766-777.
- Zheng, X. Y., D. W. Wolff, S. Baudracco-Rnaas and M. Pitrat. 1999. Development and restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) linked to the Fom-2 fusarium wilt resistance gene in melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical Applied Genetics* 99: 453-463.

Zou, J. J., R. J. Singh and T. Hymowitz. 2004. SSR marker and ITS cleaved amplified polymorphic sequence análisis of soybean x *Glycine tomentella* intersubgeneric derived lines. Theoretical Applied Genetics 109: 769-774.

ANEXOS

Cuadro 1A. Origen y raza de las variedades nativas de maíz azul evaluadas para la caracterización agronómica y molecular.

COLECTA	COLOR	Origen	Raza
JJLR-002	Azul	Milpa Alta, D.F.	Chalqueño
JJLR-004	Azul	Cuijingo, Juchitepec	Chalqueño
JJLR-388 05	Azul	Chiltepec, Coatepec Arinas, México	Chalqueño
JJLR-010	Azul	Nativitas, Estado de México	Chalqueño
JJLR-275	Azul	Desconocido	Chalqueño
JJLR-080	Azul	Mariano Escobedo	Chalqueño
JJLR-024	Azul	Oriental, Puebla	Chalqueño
JJLR-026	Azul	Otumba, Edo. De México	Chalqueño
JJLR-027	Azul	Atlacamulco Edo. De México	Chalqueño
JJLR-029	Azul	Juchitepec Edo. México	Chalqueño
JJLR-031	Azul	Tehuacan, Puebla	Chalqueño
JJLR-033	Azul	Acolmán, Edo. De México	Chalqueño
JJLR-597 05	Azul	Torrecilla; Mpio. Tepelmeme	Chalqueño
JJLR-046	Azul	Apizaco, Tlaxcala	Chalqueño
JJLR-581 05	Azul	Independencia	Chalqueño
JJLR-052	Azul	Textutlan, Puebla	Chalqueño
JJLR-055	Azul	Toluca, Edo. De México	Chalqueño
JJLR-056	Azul	Calpulalpan, Tlaxcala	Chalqueño
JJLR-061	Azul	Villanueva Acatango, Puebla	Chalqueño
JJLR-063	Azul	Sta. Cruz Tepexpan, Jiquilpan, México	Cónico
JJLR-416	Azul	El Morai Nacaltepec Cuicatlan.	Chalqueño
JJLR-075	Azul	Teotihuacan, Edo de México	Chalqueño
JJLR-425	Azul	Llano Grande Coatepec Arinas, México	Chalqueño
JJLR-087	Azul	Otumba, México	Conico
JJLR-095	Azul	Xocimilco, D. F.	Chalqueño
JJLR-096	Azul	Ozumba, Edo. De México	Chalqueño
JJLR-338 05	Azul	Amaltepec Edo. De México	Chalqueño
JJLR-098	Azul	Tizayuca, Hidalgo	Chalqueño
JJLR-160	Azul	Tizayuca, Hidalgo	Chalqueño
JJLR-395 05	Azul	Ixtlahuaca de Villa Coatepec, México	Chalqueño
JJLR-366 05	Azul	Desconocido	Chalqueño
Peruano 2	Guinda	Desconocido	Chalqueño
JJLR-273	Azul	Desconocido	Chalqueño
JJLR-240 05	Azul	Tlaxtalpan, Edo. de México	Chalqueño
JJLR-286	Azul	San Felipe Zacatepec Axapusco, México	Chalqueño

Cuadro 1A. continuación.

JJLR-288	Azul	Sta. Cruz Atizapan Edo. De Méx.	Chalqueño
JJLR-291	Azul	Ozumba, México	Chalqueño
JJLR-314	Azul	Tecteppec, Pue.	Chalqueño
JJLR-318	Azul	Teotihuacán, México	Chalqueño
JJLR-321	Azul	Tepetlaxtoc, Estado de México	Chalqueño
JJLR-356	Azul	Matahuales Aquiles Serda Pue.	Chalqueño
JJLR-331	Azul	Conla de Juan C., Tlax.	Chalqueño
JJLR-160 05	Azul	Tizayuca, Hidalgo	Chalqueño
JJLR-333	Azul	Panzaco Tlax.	Chalqueño
Tlachichuca	Negro	Tlachichuca, Pluebla	Cónico
Ixtlauaca 05	Azul	Ixtlauaca, Estado de México	Chalqueño
JJLR-372	Azul	Huachinango Puetenango Flores	Chalqueño
CIMMYT 05	Azul	Compuesto Valles Altos	Chalqueño
JJLR-747	Rojo	San Luis Huexotla Texcoco, Edo. de México.	Chalqueño
JJLR-381	Azul	Coatexmola San Francisco Pue.	Chalqueño
JJLR-383	Azul	Domingo Arenas Pue.	Cónico
JJLR-386	Azul	San Felipe del Progreso Edo. de Mex.	Chalqueño
JJLR-387	Azul	Purificacion Mpi. San Juan Teotihuacan	Chalqueño
JJLR-388	Azul	Chiltepec Coatepec Arianas Méx.	Chalqueño
JJLR-389	Azul	San Miguel Tenextatiloyan Pue.	Chalqueño
JJLR-390	Azul	San Miguel Tenextatiloyan Pue.	Chalqueño
JJLR-392	Azul	Metztitlan Hgo.	Chalqueño
JJLR-393	Azul	El carmen Tequexauitlan Tlax.	Chalqueño
JJLR-58*	Rojo	Sinahua, Guerrero	Cónico
JJLR-396	Azul	Puebla	Chalqueño
JJLR-397	Azul	Santiago de Anaya Hgo.	Chalqueño
JJLR-404	Azul	San Salvador el Seco Edo. Pue.	Chalqueño
JJLR-411	Azul	Mpio. Jiquimilco	Chalqueño
JJLR-423	Azul	Boca del Montes Ajalpan Pue.	Chalqueño
JJLR-424	Azul	Tlanalapan Texmelucon Pue	Chalqueño
JJLR-426	Azul	San Salvador el Seco Edo. Pue.	Chalqueño
JJLR-427	Azul	Monlango Hgo.	Chalqueño

Cuadro 1A. continuación.

JJLR-428	Azul	San Mateo Coatepec Pue.	Chalqueño
JJLR-429	Azul	Motoabola Munci Mixquihuala Hgo.	Chalqueño
JJLR-500	Azul	Villa Gran Nopala de Villa Grande Hidalgo	Chalqueño
JJLR-501	Azul	Tenango Puebla	Chalqueño
JJLR-502	Guinda	La franga Zaragoza Puebla	Chalqueño
JJLR-503	Rojo	Pueblo Nuevo Municipio Acambay Edo. De Méx.	Cónico
JJLR-519	Azul	Emilio Carranza Zautla Edo. De Puebla	Chalqueño
JJLR-732	Rojo	La Mision, Hidalgo	Cónico
JJLR-521	Azul	Tunitlan Chilcuahutla Hidalgo	Cónico
JJLR-522	Azul	Emilio Carranza Municipio Zautla Edo. De Puebla	Cónico
JJLR-453	Rojo	Jonetlan, Tecamachalco, Puebla	Cónico
JJLR-309	Rojo	Huazulco, Tecamac, Mexico	Cónico
JJLR-579	Azul	Las trancas Zaragoza, Puebla	Chalqueño
JJLR-583	Azul	Chichicaxtle Agua Blanca D.I. Hidalgo	Chalqueño
JJLR-587	Azul	Santa Cecilia Tepetitlan Hachichula Puebla	Chalqueño
JJLR-591	Azul	Almolongo Tepexi , Puebla	Chalqueño
JJLR-593	Azul	Almolongo Tepexi Puebla	Chalqueño
JJLR-595	Azul	Santa Cecilia Tep. Mcipio. Hachichula Puebla	Chalqueño
JJLR-598	Azul	Fco. Villa Mpio. San Salvador Edo. De Hidalgo	Chalqueño
JJLR-600	Azul	Almolongo; Mpio. Tepexi Edo. Puebla	Chalqueño
JJLR-617	Azul	Tecamac, Edo. De México	Chalqueño
JJLR-619	Azul	San Miguel Pipiyola, Tlaxcala	Chalqueño
JJLR-622	Azul	Metepec, Hidalgo	Cónico
JJLR-623	Azul	Otumba, Edo. De México	Chalqueño
JJLR-626	Azul	Timilpan, Edo. De Mexico	Chalqueño
JJLR-627	Guinda	San Andrés Jilotepec, Edo. De México	Chalqueño
JJLR-628	Azul	Timilpan, Edo de México	Cónico
JJLR-629	Azul	San Antonio Atlacomulco, Edo. De México	Chalqueño
JJLR-630	Azul	Dongu Chiapa de Mata, Edo. De México	Cónico
JJLR-631	Guinda	Dongu Chiapa de Mata, Edo. De México	Chalqueño
JJLR-633	Azul	Huamantla, Tlaxcala	Chalqueño
JJLR-634	Azul	El Palmito, Jilotepec Edo. De México	Chalqueño
JJLR-635	Azul	San Antonio, Atlacomulco	Chalqueño
JJLR-636	Azul	Huamantla, Tlaxcala	Cónico

Cuadro 1A. continuación.

JJLR-639	Azul	Temascaltepec, Edo. De México	Chalqueño
JJLR-640	Azul	Santiaguito Maxda Timilpan, Edo. De México	Cónico
JJLR-641	Azul	Santiaguito Maxda Timilpan, Edo. De México	Cónico
JJLR-645	Guinda	Puebla	Chalqueño
JJLR-647	Azul	El Paredón Chinahuapan, Puebla	Chalqueño
JJLR-648	Azul	Santiago Casandeje, Jocotitlán, Edo. De México	Chalqueño
JJLR-650	Azul	Sta. María Coatepec San Salvador el Seco, Puebla	Chalqueño
JJLR-651	Azul	La Constancia Española, Tlaxcala	Chalqueño
JJLR-652	Negro	Santiaguito Moxda Timilpan, Edo. De México	Cónico
JJLR-654	Azul	Chapa de Mota, Edo de México	Chalqueño
JJLR-655	Azul	Santiaguito Moxda Timilpan, Edo. De México	Cónico
JJLR-657	Azul	Tepeyahualco de Hidalgo, Puebla	Chalqueño
JJLR-658	Azul	Mineral del Chico, Hidalgo	Chalqueño
JJLR-659	Azul	San Salvador el Seco, Puebla	Chalqueño
JJLR-665	Azul	Atlacomulco, Edo. De México	Chalqueño
JJLR-666	Azul	San Francisco, Huamantla, Tlaxcala	Chalqueño
JJLR-671	Azul	Tenería Tenango. Edo. De México	Chalqueño
JJLR-672	Azul	Sta. Elena Cuapa de Mota Edo. De México	Chalqueño
JJLR-673	Azul	San Salvador el Seco, Puebla	Chalqueño
JJLR-675	Azul	La Garita Hueytamalco, Puebla	Chalqueño
JJLR-682	Azul	San Sebastian Tenangio, Puebla	Chalqueño
JJLR-683	Azul	Guerrero Santiago de Anaya, Hidalgo	Chalqueño
JJLR-253	Rojo	Zactlan, Puebla	Chalqueño
JJLR-688	Azul	Villa de Tezontepec, Hidalgo	Chalqueño
JJLR-691	Azul	San Miguel Pipillotla Española, Tlaxcala	Chalqueño
JJLR-692	Azul	Sta. Ana Ocuilón, Edo. De México	Chalqueño
JJLR-697	Azul	Villa del Carbón, Edo. De México	Cónico
JJLR-700	Azul	Amanalco de Becerra, Edo. De México	Chalqueño
JJLR-701	Azul	Camltepec Zacapuaxtla, Puebla	Chalqueño
JJLR-702	Azul	San Nicolas Buenos Aires	Chalqueño
JJLR-704	Azul	San Andrés Payuco Cuyuaco, Puebla	Cónico
JJLR-708	Azul	La Tarjea Apaxco, Edo de México	Chalqueño
JJLR-717	Negro	Coyutla Tepehuacan Guerrero, Hidalgo	Chalqueño
JJLR-719	Azul	Tianguis Manalco, Puebla	Chalqueño
JJLR-722	Azul	San Francisco Chalchihuapan, Edo. De México	Chalqueño
JJLR-723	Azul	Dongu Chapa de Mora, Edo. de México	Chalqueño

Cuadro 1A. continuación.

JJLR-724	Azul	Agua Blanca de Iturbide, Hidalgo	Chalqueño
JJLR-725	Azul	Ixtepec, Puebla	Chalqueño
JJLR-726	Azul	San Antonio, Tepetitlan Chiautla	Chalqueño
JJLR-727	Azul	Guadalupe Victoria, Puebla	Chalqueño
JJLR-731	Azul	San Fco. Metepec España, Tlaxcala	Cónico
JJLR-750	Azul	Mangongui La Misión, Hidalgo	Chalqueño
YSM-21	Azul	INIFAP	Chalqueño
YSM-41	Azul	INIFAP	Chalqueño
YSM-47	Azul	INIFAP	Chalqueño
YSM-62	Azul	INIFAP	Chalqueño
YSM-69	Azul	INIFAP	Chalqueño
YSM-111	Azul	INIFAP	Chalqueño
YSM-112	Azul	INIFAP	Chalqueño
YSM-115	Azul	INIFAP	Chalqueño
YSM-147	Azul	INIFAP	Chalqueño
YSM-156	Azul	INIFAP	Chalqueño
YSM-203	Azul	INIFAP	Chalqueño
YSM-221	Azul	INIFAP	Chalqueño
YSM-222	Azul	INIFAP	Chalqueño
YSM-244	Azul	INIFAP	Chalqueño
YSM-251	Azul	INIFAP	Chalqueño
YSM-255	Azul	INIFAP	Chalqueño
YSM-257	Azul	INIFAP	Chalqueño
YSM-365	Azul	INIFAP	Chalqueño
JJLR-126		Nat. Cuautempa, Puebla	Chalqueño
JJLR-602	Azul	Desconocido	Chalqueño
JJLR-609	Azul	Desconocido	Chalqueño
JJLR-47	Azul	Jacala, Hidalgo	Chalqueño
JJLR-84	Azul	Otumba México	Chalqueño
JJLR-118	Azul	Desconocido	Chalqueño
JJLR-241	Azul	Desconocido	Chalqueño
JJLR-338	Azul	Amaltepec Edo. De México	Chalqueño
JJLR-361	Azul	Olleros Bustamante	Chalqueño
JJLR-364	Azul	Union de Juarez	Chalqueño
Az01xLínea	Azul	Testigos 1	Chalqueño
Az13xLínea	Azul	Testigos 2	Chalqueño

Cuadro 2A. Comparación de medias de 15 variables agronómicas evaluadas en 175 variedades nativas de maíz azul.

TRAT	NPP	DFM ^a	DFF ^a	AP(cm) ^a	AM(cm)	MPP	LM(cm) ^a	DMM(cm) ^a
JJLR-388*	8.0 A	93.5	106.5	244.0	156.0 ABC	1.18 A	11.1	3.85 GH
JJLR-080	8.5 A	101.5	100.5	225.0	137.5 ABC	0.84 A	11.8	4.70
JJLR-024	13.6 A	82.0 K	86.0	230.3	123.0 ABC	0.91 A	11.8	4.10
JJLR-026	15.6 A	82.0	86.0	236.0	166.0 ABC	0.94 A	14.5	4.33
JJLR-027	16.0 A	82.0 K	85.3 FGH	233.6	145.3 ABC	0.63 A	13.3	4.36
JJLR-029	13.3 A	82.6	86.0	241.0	173.3 AB	0.69 A	15.7 ABC	4.33
JJLR-033	11.0 A	90.6	87.0	204.3 AB	109.6 ABC	0.60 A	14.3	4.33
JJLR-056	12.6 A	88.6	85.3 FGH	235.0	146.3 ABC	0.82 A	13.6	4.70
JJLR-416	14.5 A	106.5 ABCD	109.0 A	237.0	157.5 ABC	1.12 A	12.8	4.15
JJLR-075	15.0 A	92.3	101.6	206.0	118.0 ABC	0.60 A	13.1	4.20
JJLR-425	9.6 A	101.6	103.6	208.0	127.6 ABC	0.90 A	13.6	4.86 A
JJLR-395	16.0 A	106.5 ABCD	108.0 AB	208.5	127.5 ABC	0.80 A	11.9	4.30
JJLR-273	13.5 A	91.0	91.5	245.0	165.5 ABC	0.39 A	14.1	4.60
JJLR-240	11.5 A	98.5	100.5	202.5 AB	133.0 ABC	0.51 A	11.8	4.25

^a Únicamente se indican las variedades que mostraron diferencia estadística, todas las demás variedades estadísticamente fueron iguales y por razones de presentación no se mencionan.

Cuadro 2A. Continuación.

TRAT	NHM ^a	NGH ^a	PG(%) ^a	PDC (kg/par)	RPP(g/plan)	PS (g) ^a	DOL(cm)
JJLR-004	14.0	31.7	85.5	2.00 ABCD	216.4 A	64.7	2.15 BCD
JJLR-388*	17.0 A	24.5	83.4	1.35 ABCD	168.7 AB	58.0	1.85 BCD
JJLR-080	14.0	26.0	82.1 LMN	0.70 ABCD	93.5 AB	48.6	2.05 BCD
JJLR-024	12.3	24.8	83.8	1.16 ABCD	89.6 AB	54.8	1.66 CD
JJLR-027	14.3	22.8	82.3	0.76 ABCD	47.1 AB	43.3	1.90 BCD
JJLR-031	15.6	30.1	83.9	1.40 ABCD	119.5 AB	63.0	3.03 A
JJLR-046	12.0 DEF	27.7	84.2	0.60 ABCD	47.1 AB	43.2	2.30 BC
JJLR-052	15.0	28.1	87.6 ABC	1.50 ABCD	122.7 AB	61.5	1.83 BCD
JJLR-425	16.3 A	27.1	84.2	0.86 ABCD	90.3 AB	50.5	2.23 BCD
JJLR-095	14.5	33.0 ABCD	87.7 AB	1.75 ABCD	151.4 AB	70.0	2.00 BCD
JJLR-098	16.0 ABC	31.6	84.2	1.16 ABCD	94.4 AB	48.8	2.16 BCD
JJLR-160	14.6	25.1	86.3	2.20 ABC	164.2 AB	66.0	2.00 BCD
JJLR-395	11.5 F	20.5 U	83.2	1.30 ABCD	79.6 AB	53.1	1.95 BCD

^a Únicamente se indican las variedades que mostraron diferencia estadística, todas las demás variedades estadísticamente fueron iguales y por razones de presentación no se mencionan

Cuadro 2A. Continuación.

TRAT	NPP	DFM ^a	DFF ^a	AP(cm) ^a	AM(cm)	MPP	LM(cm) ^a	DMM(cm) ^a
JJLR-321	11.5 A	85.5	87.5	203.5 AB	137.0 ABC	0.52 A	14.3	4.35
JJLR-333	8.0 A	100.0	101.5	237.5	153.0 ABC	0.68 A	12.8	4.55
TLACHICH	11.3 A	88.0	88.6	233.3	150.6 ABC	0.51 A	10.0 U	3.93
JJLR-747	11.0 A	102.6	102.0	241.6	176.6 A	0.39 A	14.9	4.50
JJLR-387	13.0 A	82.0	86.3	255.3 A	163.0 ABC	1.19 A	13.0	4.03
JJLR-392	16.0 A	84.5	87.0	216.5	105.0 BC	1.01 A	12.2	4.30
JJLR-393	14.5 A	82.0	86.5	211.0	143.0 ABC	0.41 A	13.9	4.30
JJLR-58	12.0 A	111.0 AB	86.0	245.0	162.0 ABC	0.79 A	14.6	4.40
JJLR-396	11.0 A	102.0	102.0	238.6	151.0 ABC	0.74 A	13.7	4.83 A
JJLR-404	16.6 A	83.6	85.6	236.0	118.0 ABC	0.79 A	14.1	4.36
JJLR-423	14.5 A	105.0	106.0	244.5	146.0 ABC	1.08 A	10.5 RSTU	4.50
JJLR-424	11.5 A	84.5	90.0	245.0	149.5 ABC	0.74 A	15.8 AB	4.55
JJLR-426	13.3 A	84.3	87.3	240.0	129.3 ABC	1.23 A	10.3 STU	4.30
JJLR-427	13.5 A	111.5 A	109.0 A	240.0	137.5 ABC	0.91 A	10.2 UT	4.30

^a Únicamente se indican las variedades que mostraron diferencia estadística, todas las demás variedades estadísticamente fueron iguales y por razones de presentación no se mencionan.

Cuadro 2A. Continuación.

TRAT	NHM ^a	NGH ^a	PG(%) ^a	PDC (kg/par)	RPP(g/plan)	PS (g) ^a	DOL(cm)
JJLR-321	15.0	33.2 ABCD	84.6	1.00 ABCD	86.7 AB	73.1	1.75 BCD
JJLR-331	16.0	28.5	87.4 ABCD	1.35 ABCD	89.9 AB	68.0	1.90 BCD
JJLR-333	14.5	26.7	83.0	0.50 BCD	68.2 AB	52.4	1.95 BCD
TLACHICH	13.6	21.5 STU	82.5	0.76 ABCD	66.6 AB	58.7	2.13 BCD
IXTLAHUA	17.0 A	28.7	84.0	1.20 ABCD	101.5 AB	49.1	2.05 BCD
JJLR-383	15.0	30.6	87.5 ABCD	2.30 AB	151.2 AB	63.1	1.86 BCD
JJLR-386	14.3	23.5	83.4	0.50 BCD	53.9 AB	54.4	1.86 BCD
JJLR-387	15.0	28.8	86.8	2.36 A	211.9 A	62.4	2.00 BCD
JJLR-388	14.5	34.7 A	84.2	1.60 ABCD	133.3 AB	61.0	2.10 BCD
JJLR-393	12.0 DEF	30.5	84.4	0.60 ABCD	38.9 AB	58.4	1.90 BCD
JJLR-396	15.6	30.0	84.1	0.70 ABCD	64.3 AB	60.6	2.06 BCD
JJLR-423	12.5	21.7 RSTU	86.4	1.75 ABCD	123.7 AB	65.7	1.90 BCD
JJLR-424	16.0 ABC	32.7	84.3	1.10 ABCD	96.8 AB	66.6	1.95 BCD
JJLR-429	14.0	28.0	83.6	1.25 ABCD	125.0 AB	64.5	2.00 BCD

^a Únicamente se indican las variedades que mostraron diferencia estadística, todas las demás variedades estadísticamente fueron iguales y por razones de presentación no se mencionan.

Cuadro 2A. Continuación.

TRAT	NPP	DFM ^a	DFF ^a	AP(cm) ^a	AM(cm)	MPP	LM(cm) ^a	DMM(cm) ^a
JJLR-501	16.3 A	82.6	87.6	240.0	151.0 ABC	0.67 A	16.2 A	4.63
JJLR-503	11.6 A	99.3	84.3 FGH	230.3	120.3 ABC	0.75 A	14.5	4.60
JJLR-519	13.6 A	82.0 K	86.0	225.0	145.6 ABC	0.66 A	12.4	4.33
JJLR-732	9.0 A	106.5 ABCD	90.0	245.0	165.0 ABC	0.33 A	13.0	4.45
JJLR-521	12.3 A	100.0	87.3	235.0	128.3 ABC	0.60 A	10.3 STU	4.36
JJLR-309	10.0 A	103.0	88.0	180.0 B	102.5 C	0.81 A	10.7	3.75 H
JJLR-598	12.5 A	84.0	88.0	205.0 AB	120.0 ABC	0.60 A	11.0	3.85 GH
JJLR-617	12.0 A	83.3	87.6	240.3	143.3 ABC	1.42 A	14.5	4.53
JJLR-619	16.6 A	82.0	87.0	243.6	134.3 ABC	0.86 A	10.8	4.60
JJLR-628	14.0 A	90.6	84.3 FGH	251.0	160.6 ABC	0.62 A	13.5	4.60
JJLR-629	11.6 A	82.0	86.6	236.0	141.6 ABC	1.38 A	12.8	4.36
JJLR-631	12.0 A	85.0	89.6	233.3	151.6 ABC	1.19 A	15.5 ABCD	4.66
JJLR-639	10.6 A	85.0	89.3	251.6	153.0 ABC	0.95 A	14.2	4.86 A
JJLR-641	9.3 A	86.3	85.0 FGH	238.6	135.3 ABC	0.91 A	13.9	4.36

^a Únicamente se indican las variedades que mostraron diferencia estadística, todas las demás variedades estadísticamente fueron iguales y por razones de presentación no se mencionan.

Cuadro 2A. Continuación.

TRAT	NHM ^a	NGH ^a	PG(%) ^a	PDC (kg/par)	RPP(g/plan)	PS (g) ^a	DOL(cm)
JJLR-501	13.6	33.5 ABC	85.4	1.56 ABCD	92.3 AB	64.3	2.06 BCD
JJLR-503	14.0	34.0 AB	84.5	0.83 ABCD	71.2 AB	66.1	1.96 BCD
JJLR-732	14.5	25.5	84.4	0.25 BCD	27.7 B	46.2	2.00 BCD
JJLR-522	13.3	26.1	82.1 KLMN	0.56 ABCD	51.7 AB	57.2	1.86 BCD
JJLR-583	14.3	26.1	81.8 N	1.36 ABCD	92.2 AB	63.2	2.03 BCD
JJLR-595	15.3	26.1	83.9	1.16 ABCD	76.6 AB	60.1	2.26 BCD
JJLR-598	12.5	24.0	83.5	0.80 ABCD	66.6 AB	53.2	1.60 D
JJLR-600	12.3	26.0	88.2 A	1.60 ABCD	128.8 AB	69.2	1.83 BCD
JJLR-617	14.6	29.5	86.1	2.26 ABC	208.0 AB	60.8	2.06 BCD

^a Únicamente se indican las variedades que mostraron diferencia estadística altamente significativa, todas las demás variedades estadísticamente fueron iguales y por razones de presentación no se escriben todas las letras.

Cuadro 2A. Continuación.

TRAT	NPP	DFM ^a	DFP ^a	AP(cm) ^a	AM(cm)	MPP	LM(cm) ^a	DMM(cm) ^a
JJLR-647	14.3 A	82.6	86.6	218.6	116.0 ABC	0.63 A	13.6	4.26
JJLR-648	14.0 A	82.6	88.0	241.3	153.0 ABC	1.01 A	15.1	4.86 A
JJLR-651	12.0 A	82.0 K	87.0	231.0	133.6 ABC	1.04 A	13.7	4.40
JJLR-654	11.3 A	86.0	88.3	255.0 A	154.0 ABC	1.47 A	15.3	4.53
JJLR-659	11.3 A	82.0	86.6	232.6	143.0 ABC	1.25 A	16.2 A	4.40
JJLR-671	10.0 A	96.0	100.3	247.3	149.3 ABC	1.24 A	15.4	4.83 AB
JJLR-692	11.0 A	95.0	100.0	240.0	150.0 ABC	0.44 A	12.9	4.45
JJLR-704	13.6 A	82.0	83.0 FGH	236.6	129.6 ABC	0.79 A	14.0	4.33
JJLR-717	9.0 A	109.3 ABC	107.3 AB	254.3 A	127.3 ABC	0.62 A	13.7	4.50
JJLR-719	11.3 A	86.0	91.0	227.0	142.0 ABC	1.52 A	12.6	4.50
JJLR-722	12.3 A	82.0 K	86.0	243.3	141.6 ABC	1.15 A	13.9	4.33
JJLR-725	12.5 A	96.0	91.5	259.0 A	140.0 ABC	0.45 A	12.6	4.30

^a Únicamente se indican las variedades que mostraron diferencia estadística, todas las demás variedades estadísticamente fueron iguales y por razones de presentación no se mencionan.

Cuadro 2A. Continuación.

TRAT	NHM [*]	NGH [*]	PG(%) [*]	PDC (kg/par)	RPP(g/plan)	PS (g) [*]	DOL(cm)
JJLR-647	13.6	24.5	78.7 O	0.53 ABCD	38.8 AB	48.4	2.13 BCD
JJLR-648	13.6	27.0	85.1	1.46 ABCD	103.3 AB	54.8	2.30 BC
JJLR-658	15.0	23.5	81.8 MN	1.13 ABCD	109.7 AB	48.0	2.16 BCD
JJLR-688	11.6 EF	26.8	82.5	1.10 ABCD	120.1 AB	53.6	2.06 BCD
JJLR-724	16.0	28.3	84.2	1.36 ABCD	107.9 AB	60.6	2.40 AB
JJLR-725	13.0	25.2	83.3	0.45 BCD	36.8 AB	47.2	2.00 BCD
JJLR-726	14.0	27.6	87.2	1.80 ABCD	135.1 AB	60.8	1.73 BCD

^{*} Únicamente se indican las variedades que mostraron diferencia estadística, todas las demás variedades estadísticamente fueron iguales y por razones de presentación no se mencionan.

Cuadro 2A. Continuación.

TRAT	NPP	DFM ^a	DFF ^a	AP(cm) ^a	AM(cm)	MPP	LM(cm) ^a	DMM(cm) ^a
YSM-47	14.0 A	82.0	87.0	220.0	113.3 ABC	0.71 A	11.3	3.93
YSM-62	9.0 A	82.0	86.6	233.6	122.0 ABC	1.33 A	11.4	3.90 FGH
YSM-69	11.3 A	94.6	87.3	222.0	136.3 ABC	0.86 A	13.2	3.90 FGH
YSM-221	13.6 A	82.0 K	87.0	247.0	144.6 ABC	0.82 A	15.0	4.43
JJLR-126	11.0 A	103.0	106.6 ABC	239.3	136.6 ABC	0.81 A	13.5	4.26
JJLR-47	15.5 A	83.0	87.0	246.0	146.5 ABC	1.52 A	12.7	4.05
Az01x1lin	13.0 A	82.0	87.3	224.6	127.6 ABC	1.00 A	12.8	4.46
Az13x1lin	12.6 A	82.6	86.3	225.0	119.6 ABC	1.11 A	14.6	4.40

^a Únicamente se indican las variedades que mostraron diferencia estadística, todas las demás variedades estadísticamente fueron iguales y por razones de presentación no se escriben mencionan.

Cuadro 2A. Continuación.

TRAT	NHM ^a	NGH ^a	PG(%) ^a	PDC (kg/par)	RPP(g/plan)	PS (g) ^a	DOL(cm)
YSM-47	12.3	24.1	83.5	0.73 ABCD	51.8 AB	44.6	1.76 BCD
YSM-62	13.6	21.5 STU	84.1	0.93 ABCD	103.7 AB	46.6	1.86 BCD
YSM-69	13.0	21.0 TU	83.5	0.80 ABCD	70.5 AB	45.0	1.90 BCD
YSM-222	14.3	25.6	83.9	1.26 ABCD	106.0 AB	53.5	2.06 BCD
JJLR-47	13.0	28.0	86.2	2.35 A	162.5 AB	53.3	1.95 BCD
Az01x1lin	15.6	24.3	83.3	1.30 ABCD	106.7 AB	58.5	2.16 BCD
Az13x1lin	14.3	28.5	86.3	1.56 ABCD	131.9 AB	62.1	1.96 BCD

^a Únicamente se indican las variedades que mostraron diferencia estadística, todas las demás variedades estadísticamente fueron iguales y por razones de presentación no se mencionan.

Cuadro 3A. Rangos de peso molecular (pb) establecidos para las bandas de cada marcador SSR.

phi051			phi115			phi062		
No. de bandas arriba	Rango por peso (pb)		No. de bandas arriba	Rango por peso (pb)		No. de bandas	Rango por peso (pb)	
1	149-146		1	327-324		1	167-164	
2	145-143		2	323-320		2	163-161	
3	142-140		3	318-315		3	160-158	
4	139-137		4	314-311		4	157-155	
5	136-134		5	310-307		5	154-152	
6	133-131		6	306-303		6	151-149	
7	130-128		7	302-299		7	148-146	
8	127-125		8	295-292		8	145-143	
			9	291-288		9	139-137	
			10	287-284		10	136-134	
			11	283-280				
			12	279-276				
			13	275-272				
No. de bandas abajo	Rango por peso (pb)		No. de bandas abajo	Rango por peso (pb)				
9	149-147		14	305				
10	146-144		15	303-300				
11	143-141		16	296-293				
12	140-138		17	292-289				
13	137-135		18	288-285				
14	134-132		19	284-281				
15	131-129		20	280-277				
16	128-126		21	276-273				
17	125-123		22	272-269				
			23	268-265				
			24	264-261				

Cuadro 3A. Continuación.

phi033				phi093		phi085	
No. de banda arriba	Rango por peso (pb)	No. de bandas	Rango por Peso(pb)	No. de bandas	Rango por Peso(pb)	No. de bandas arriba	Rango por peso (pb)
1	259-257	1	311-308	1	287-283	1	287-283
2	256-254	2	307-304	2	282-278	2	282-278
3	253-251	3	303-300	3	277-273	3	277-273
4	250-248	4	299-296	4	272-268	4	272-268
5	247-245	5	295-292	5	267-263	5	267-263
6	244-242	6	291-288	6	262-258	6	262-258
7	241-239	7	287-284	7	257-253	7	257-253
8	238-236	8	283-280	8	252-248	8	252-248
9	235-233	9	276-279	9	247-243	9	247-243
10	232-230	10	275-272				
11	229-227	11	271-268				
12	226-224	12	267-264				
13	223-221						
14	220-216						
No. de bandas abajo	Rango por peso (pb)	No. de bandas abajo	Rango por peso (pb)	No. de bandas abajo	Rango por peso (pb)	No. de bandas abajo	Rango por peso (pb)
15	253-251	10	272-268	10	272-268	10	272-268
16	250-248	11	267-263	11	267-263	11	267-263
17	247-245	12	262-258	12	262-258	12	262-258
18	229-227	13	257-253	13	257-253	13	257-253
19	224-222	14	252-248	14	252-248	14	252-248
20	220-218	15	247-243	15	247-243	15	247-243
		16	242-238	16	242-238	16	242-238
		17	237-233	17	237-233	17	237-233

Cuadro 3A. Continuación.

phi96342			phi159819			phi448880		
No. de bandas arriba	Rango por peso (pb)	No. de bandas arriba	Rango por peso (pb)	No. de bandas arriba	Rango por peso (pb)	No. de bandas arriba	Rango por peso (pb)	No. de bandas arriba
1	254-251	1	140-138	1	140-138	1	91-184	1
2	250-247	2	137-135	2	137-135	2	183-181	2
3	246-243	3	134-132	3	134-132	3	180-178	3
4	242-239	4	131-129	4	131-129	4	177-175	4
5	238-235	5	128-126	5	128-126	5	174-172	5
6	234-231	6	125-123	6	125-123	6	171-169	6
7	230-227	7	122-120	7	122-120	7	168-166	7
8	226-223					8	165-163	8
9	222-219					9	162-160	9
10	218-215					10	159-157	10
11	214-211					11	156-154	11
12	210-207							
13	206-203							
No. de bandas abajo	Rango por peso (pb)	No. de bandas abajo	Rango por peso (pb)	No. de bandas abajo	Rango por peso (pb)	No. de bandas abajo	Rango por peso (pb)	No. de bandas abajo
14	246-239	8	132-130	8	132-130	12	175-170	12
15	238-235	9	129-127	9	129-127	13	169-167	13
16	234-231	10	126-124	10	126-124	14	166-164	14
17	230-227	11	123-121	11	123-121	15	163-161	15
18	226-223	12	120-118	12	120-118	16	160-158	16
19	222-219	13	117-115	13	117-115	17	157-155	17
20	218-215					18	154-152	18
21	214-211					19	151-149	19
22	210-207					20	148-146	20
23	203-206					21	145-143	21

Cuadro 4A. Grupos conformados de variedades nativas de maíz azul de acuerdo con las variables discriminantes canónicas.

GRUPO	VARIEDAD NATIVA	ORIGEN
1	JJLR-389	Puebla
1	JJLR-519	Puebla
1	JJLR-731	Tlaxcala
1	Az01xProbador	Testigo
1	JJLR-579	Puebla
1	YSM-244	INIFAP
1	JJLR-004	Edo. de Méx.
1	JJLR-617	Edo. de Méx.
1	YSM-255	INIFAP
1	JJLR-650	Puebla
1	JJLR-704	Puebla
1	JJLR-702	Puebla
1	JJLR-383	Puebla
1	JJLR-763	Puebla
1	JJLR-052	Puebla
1	JJLR-291	Edo. de Méx.
1	JJLR-426	Puebla
1	JJLR-726	Edo. de Méx.
1	JJLR-387	Edo. de Méx.
1	JJLR-47	Hidalgo
1	JJLR-160	Hidalgo
1	JJLR-600	Puebla
1	JJLR-331	Tlaxcala
2	JJLR-645	Puebla
2	JJLR-665	Edo. de Méx.
2	JJLR-633	Tlaxcala
2	YSM-41	INIFAP
2	JJLR-672	Edo. de Méx.
2	JJLR-651	Tlaxcala
2	JJLR-623	Edo. de Méx.

Cuadro 4A. Continuación.

2	JJLR-031	Puebla
2	JJLR-500	Hidalgo
2	JJLR-654	Edo. de Méx.
2	JJLR-666	Tlaxcala
2	JJLR-388	Edo. de Méx.
2	JJLR-397	Hidalgo
2	JJLR-056	Tlaxcala
2	JJLR-288	Edo. de Méx.
2	JJLR-366 05	Desconocido
2	JJLR-84	Edo. de Méx.
2	JJLR-639	Edo. de Méx.
2	JJLR-691	Tlaxcala
2	JJLR-098	Hidalgo
2	YSM-365	INIFAP
2	JJLR-657	Puebla
2	JJLR-722	Edo. de Méx.
2	JJLR-648	Edo. de Méx.
2	JJLR-630	Edo. de Méx.
2	JJLR-631	Edo. de Méx.
2	JJLR-024	Puebla
2	JJLR-356	Puebla
2	JJLR-635	Edo. de Méx.
2	JJLR-591	Puebla
2	JJLR-628	Edo. de Méx.
2	JJLR-655	Edo. de Méx.
2	JJLR-390	Puebla
2	JJLR-321	Edo. de Méx.
2	JJLR-424	Puebla
2	JJLR-273	Desconocido
2	JJLR-719	Puebla
2	JJLR-029	Edo. de Méx.
2	JJLR-640	Edo. de Méx.

Cuadro 4A. Continuación.

2	JJLR-286	Edo. de Méx.
2	JJLR-095	D. F.
2	JJLR-501	Puebla
3	JJLR-381	Puebla
3	JJLR-118	Desconocido
3	JJLR-364	Tlaxcala
3	Az01xProbador	Testigo
3	JJLR-453	Puebla
3	JJLR-675	Puebla
3	JJLR-626	Edo. de Méx.
3	JJLR-627	Edo. de Méx.
3	JJLR-052	Puebla
3	JJLR-723	Edo. de Méx.
3	JJLR-393	Tlaxcala
3	JJLR-609	Desconocido
3	JJLR-619	Tlaxcala
3	JJLR-361	Edo. de Méx.
3	YSM-203	INIFAP
3	YSM-251	INIFAP
3	JJLR-597 05	Puebla
3	JJLR-727	Puebla
3	YSM-147	INIFAP
3	YSM-156	INIFAP
3	JJLR-641	Edo. de Méx.
3	JJLR-652	Edo. de Méx.
3	JJLR-411	Hidalgo
3	JJLR-587	Puebla
3	JJLR-583	Hidalgo
3	JJLR-636	Tlaxcala
3	JJLR-629	Edo. de Méx.
3	JJLR-055	Edo. de Méx.
3	Peruano 2	Desconocido

Cuadro 4A. Continuación.

3	JJLR-096	Edo. de Méx.
3	YSM-222	INIFAP
3	JJLR-688	Hidalgo
3	JJLR-750	Hidalgo
3	JJLR-026	Edo. de Méx.
3	YSM-221	INIFAP
3	JJLR-063	Edo. de Méx.
3	JJLR-392	Hidalgo
3	JJLR-404	Puebla
3	JJLR-622	Hidalgo
3	JJLR-697	Edo. de Méx.
3	JJLR-338	Edo. de Méx.
3	JJLR-386	Edo. de Méx.
3	JJLR-428	Puebla
3	JJLR-593	Puebla
3	JJLR-503	Edo. de Méx.
3	JJLR-061	Puebla
3	JJLR-429	Hidalgo
3	JJLR-700	Edo. de Méx.
3	JJLR-581 05	Tlaxcala
3	YSM-112	INIFAP
3	YSM-115	INIFAP
3	JJLR-602	Desconocido
3	JJLR-659	Puebla
3	JJLR-318	Edo. de Méx.
4	YSM-21	INIFAP
4	YSM-111	INIFAP
4	JJLR-598	Hidalgo
4	YSM-47	INIFAP
4	JJLR-634	Edo. de Méx.
4	JJLR-725	Puebla
4	YSM-62	INIFAP

Cuadro 4A. Continuación.

4	JJLR-521	Hidalgo
4	JJLR-522	Puebla
4	Tlachichuca	Puebla
4	JJLR-701	Puebla
4	JJLR-024	Puebla
4	YSM-69	INIFAP
4	JJLR-309	Edo. de Méx.
4	JJLR-388 05	Edo. de Méx.
4	JJLR-647	Puebla
5	JJLR-724	Hidalgo
5	JJLR-241	Desconocido
5	JJLR-338	Edo. de Méx.
5	JJLR-683	Hidalgo
5	JJLR-160 05	Hidalgo
5	JJLR-682	Puebla
5	JJLR-597 05	Hidalgo
5	JJLR-717	Hidalgo
5	JJLR-080	Puebla
5	JJLR-333	Tlaxcala
5	JJLR-595	Puebla
5	JJLR-002	D, F.
5	JJLR-075	Edo. de Méx.
5	JJLR- 502	Puebla
5	JJLR-253	Puebla
5	JJLR- 126	Puebla
5	JJLR-314	Puebla
5	JJLR-708	Edo. de Méx.
5	YSM-257	INIFAP
5	JJLR-396	Puebla
5	JJLR-671	Edo. de Méx.
5	JJLR-046	Tlaxcala
5	JJLR-372	Puebla