

**ESTUDIO PRELIMINAR MOLECULAR MEDIANTE EL USO DE ADN
CLOROPLASTICO DE ACCESIONES PERTENECIENTES A UNA COLECCIÓN
DE TRABAJO DE 23 RAZAS DE MAÍZ CRIOLLO COLOMBIANO**

EDIEL ARMANDO REVELO PORTILLA

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
COORDINACIÓN GENERAL DE POSTGRADOS
PALMIRA
2013**

**ESTUDIO PRELIMINAR MOLECULAR MEDIANTE EL USO DE ADN
CLOROPLASTICO DE ACCESIONES PERTENECIENTES A UNA COLECCIÓN
DE TRABAJO DE 23 RAZAS DE MAÍZ CRIOLLO COLOMBIANO**

EDIEL ARMANDO REVELO PORTILLA

**Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Ciencias Biológicas
línea de investigación Recursos Fitogenéticos Neotropicales**

DIRIGIDO POR:

**CARLOS IVAN CARDOZO Ph.D.
CREUCI MARIA CAETANO D.Sc.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
COORDINACIÓN GENERAL DE POSTGRADOS
PALMIRA
2013**

DEDICATORIA

A mi familia y en especial a mi madre por ser mi ejemplo y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todo por todo lo que me ha brindado hasta el momento y por poner personas maravillosas en mi camino.

Quiero aprovechar este espacio para agradecer profundamente a todas aquellas personas que de alguna manera, forman parte importante de este logro tan significativo para mí. Considero que esta tesis es fruto de un gran trabajo durante estos años, y el alcance de todas las metas propuestas, tanto académicas como de desarrollo personal.

Hago palmaria mi profunda gratitud a la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, porque en ella mi formación académica se vio enriquecida, adquiriendo un panorama más amplio.

Manifiesto mi sincero agradecimiento a la Dra. Creuci María Caetano, por su gran apoyo ha logrado de este tiempo, tanto en el ámbito académico como en el personal. Agradezco mucho la confianza vertida en mí y a la vez agradezco el entusiasmo que siempre mostró en la realización de este trabajo, pero sobre todo, le doy gracias por su gran calidad humana y por todo el tiempo que dedicó a este proyecto.

Asimismo, agradezco al Dr. Carlos Iván Cardozo Conde por el gran apoyo y acompañamiento en la elaboración de este documento.

Expreso mi agradecimiento al comité evaluador, por sus observaciones a este trabajo.

No me puedo olvidar de todas las personas que he conocido a largo de este tiempo, así como todos mis amigos y compañeros por todos los momentos compartidos.

Mi aprecio también para los profesores de posgrado, quienes aportaron y compartieron conmigo sus conocimientos.

La Facultad y los jurados de tesis
no se harán responsables de las
ideas emitidas por el autor.

Artículo 24, Resolución 04 de 1974

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN.....	12
2.	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivo principal.....	14
2.2	Objetivos específicos	14
3.	MARCO REFERENCIAL	15
3.1	Clasificación taxonómica del maíz.	15
3.2	Diversidad racial del maíz.	16
3.3	Origen, evolución, domesticación y dispersión del Maíz.	16
3.4	Estudio citogenético del maíz.....	18
3.5	Características morfológicas de la planta.	18
3.6	Clasificación de las razas criollas en Colombia	19
3.7	Importancia del maíz.....	22
3.8	Valor nutricional	22
3.9	Principales productores.....	23
3.10	Diversidad genética.....	24
3.11	Análisis moleculares en maíz.....	25
3.13	Aislamiento del ADN	25
3.14	Marcadores cloroplásticos ADNcp	26
4.	DISEÑO METODOLÓGICO	27
4.1	Localización.	27
4.2	Material biológico.	27
4.3	Germinación del material.	28
4.4	Extracción de ADN.....	28
4.5	Cuantificación del ADN.	29
4.6	Amplificación del ADN mediante PCR	29
4.7	Visualización de los productos PCR	30
4.8	Secuenciación.....	31
4.9	Análisis bioinformático de datos.....	31
5.	RESULTADOS Y DISCUSION.	33
5.1	Análisis de la información geográfica.....	33
5.2	Banco de ADN.	35
5.3	Tasa de éxito en la amplificación por PCR.	35
5.4	Prueba preliminar de variación de secuencias.....	37
5.5	Modelo de sustitución y frecuencia nucleotídica.	37
5.6	Análisis descriptivo.....	39
6.	CONCLUSIONES.	42
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	43
8.	ANEXOS.....	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema que muestra que el origen y domesticación de un cultivo, en un proceso que consta de un sinnúmero de etapas que, a su vez, pueden agruparse en la predomesticación que origina a la planta intermedia y se inicia el proceso de domesticación (Kato, 2009)..... 17
- Figura 2. Razas de maíz criollo e indígena en Colombia, según Roberts *et al.* (1957). A: Pira; B: Pollo; C: Pira naranja; D: Negrito; E: Amagaceño; F: Cabuya; G: Imbricado; H: Maíz dulce; I: Montaña; J: Sabanero; K: Guirúa; L: Cariaco; M: Común; N: Cacao; O: Costeño; P: Puya; Q: Puya grande; R: Chococeño; S: Andaquí; T: Clavo; U: Yucatán; V: Maíz harinoso dentado.....22
- Figura 3. Diez principales países productores de maíz a nivel mundial, ordenados de mayor a menor.....23
- Figura 4. Diez principales departamentos productores de maíz en Colombia, ordenados de mayor a menor.....24
- Figura 5. A: Selección de los individuos; B: Selección y limpieza de las semillas; C: Establecimiento e identificación de los individuos para su germinación en papel toalla y agua; D: Material viviente para extracción de ADN genómico.....29
- Figura 6. Diagrama resumido de la metodología molecular utilizada en la investigación.....34
- Figura 7. Mapa de distribución geográfica de las 23 razas criollas e indígenas de maíz en Colombia, según Roberts *et al.* (1957).....36
- Figura 8. Muestras de ADN en gel de agarosa al 0.8% mediante el protocolo de Doyle y Doyle (1987) modificado por CIMMYT (2006).....37
- Figura 9. Resolución electroforética de los productos amplificados con los pares de cebadores evaluados en este estudio.....38
- Figura 10. Estructura genética construida a partir del método Tamura 3 parameter, mediante el marcador cloroplástico *AtpB-1–RbcL-1*.....41

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz (Bianchi <i>et al.</i> , 1989).....	15
Tabla 2. Razas de maíz criollo e indígena y su distribución geográfica en Colombia (Roberts <i>et al.</i> , 1957).....	20
Tabla 3. Composición química proximal de las partes principales de los granos de maíz.....	22
Tabla 4. Introducciones de <i>Zea mays</i> L. de GIRFIN/UNAL Palmira a evaluar.....	28
Tabla 5. Volumen de los cocteles para PCR.....	30
Tabla 6. Marcadores moleculares explorados en el estudio.....	31
Tabla 7. Datos de pasaporte de las introducciones de <i>Zea mays</i> L. utilizadas en el estudio.....	34
Tabla 8. Regiones genómicas exploradas para maíz en el presente estudio.....	37
Tabla 9. Estadística descriptiva para los ocho cebadores evaluados en <i>Z. mays</i> L.....	38
Tabla 10: Modelo de sustitución y frecuencia nucleotídica en la región atpB-1-rbcL-1.....	39
Tabla 11. Agrupamientos propuestos por Roberts <i>et al.</i> (1957) y Cardona (2010), frente a los obtenidos en el estudio.....	41

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Calidad de los electroferogramas utilizados en el estudio para el marcador <i>AtpB-1-RbcL-1</i>	52
Anexo 2. Ensamble de las hebras complementarias para el marcador <i>AtpB-1-Rbc-1</i> mediante el software <i>Vector advance 10.3</i>	52
Anexo 3. Correlación entre las razas de estudio mediante distancias genéticas...	53
Anexo 4. Frecuencias y sustitución de las ácidos nucleicos para el marcador <i>AtpB-1-RbcL-1</i>	53
Anexo 5. Protocolo de extracción de Doyle y Doyle (1987) a base de CTAB 1%, modificado por CIMMYT (2006).....	54

RESUMEN

ESTUDIO PRELIMINAR MOLECULAR MEDIANTE EL USO DE ADN CLOROPLASTICO DE ACCESIONES PERTENECIENTES A UNA COLECCIÓN DE TRABAJO DE 23 RAZAS DE MAÍZ CRIOLLO COLOMBIANO

Con el objetivo de explorar preliminarmente la diversidad genética existente en las 23 razas de maíz criollo e indígena descritas para Colombia por Roberts y colaboradores en la década del 50, se realizó un estudio para evaluar 28 cebadores disponibles en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. De estos, 14 amplificaron en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y fueron enviados a secuenciar a Macrogen Inc. (Korea). Posteriormente y mediante programas de Bioinformática se encontró que seis de estos cebadores presentaron un nivel alto de polimorfismo. Se consideró que la región genómica cloroplástica *AtpB-1-RbcL-1* mostró el mayor polimorfismo, utilizándose por lo tanto para evaluar 23 materiales, representantes de las 23 razas colectadas en Colombia en la década del 50. Mediante el análisis de secuencias se pudo revalidar y confrontar los grupos raciales obtenidos en el presente estudio ('razas primitivas', tres; 'razas probablemente introducidas', siete; 'razas híbridas colombianas', 13) con aquellos establecidos por Roberts *et al.* (1957), en el que se muestra dos razas 'primitivas', nueve 'probablemente introducidas' y doce 'híbridas colombianas', y a los grupos establecidos por Cardona (2010), aplicando la estrategia Ward-MLM para los mismos caracteres descritos por Roberts *et al.* (1957), donde se muestra cinco razas 'primitivas', siete 'probablemente introducidas' y nueve 'híbridas colombianas'. De este modo, se hace un aporte metodológico para revalidar datos históricos y redefinir grupos raciales.

Palabras clave: *Zea mays* L., diversidad genética, ADNcp

SUMMARY

Preliminary molecular study by using cpDNA of accessions belonging to a working collection of 23 races of Colombian maize

In order to preliminarily explore the genetic diversity in the 23 Colombian races of maize described by Roberts *et al.* in the 50s, a study evaluate 28 primers available in the Laboratory of Molecular Biology, National University of Colombia, at Palmira campus. Of these, 14 amplified in the PCR, which were sent to sequencing to Macrogen Inc. (Korea). After this and by using bioinformatics programs it was revealed that six of these primers had a high level of polymorphism. It was considered that the genomic chloroplast region *atpB-rbcL-1-1* showed the highest polymorphism, therefore was used to evaluate 23 materials, representatives of the 23 races collected in Colombia in the 50s. By analyzing sequences we could defend and confront racial groups obtained in the present study ('primitive races' three, 'probably introduced' seven, 'Colombian hybrid', 13) with those established by Roberts *et al.* (1957), shown two 'primitive', nine 'probably introduced' and twelve 'Colombian hybrid' and the groups set by Cardona (2010), applying the strategy Ward-MLM for the same characters described by Roberts *et al.* (1957), which shows five 'primitive', seven 'probably introduced' and nine 'Colombian hybrid' races. Thus, it makes a methodological contribution to validate historical data and redefine racial groups.

Key words: *Zea mays* L., genetic diversity, cpDNA

1. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los más importantes recursos fitogenéticos utilizados en la alimentación y la agricultura de las comunidades tradicionales e indígenas en Suramérica. En esta región, considerada uno de los centros de diversificación del cultivo, las culturas precolombinas establecieron una relación de interdependencia hombre-maíz que se mantiene hasta nuestros días (Caetano, 2003).

La gran diversidad de los maíces en Suramérica guarda relación con su geografía e historia. El aislamiento geográfico permitió el desarrollo de nuevas formas principalmente en las tierras altas (Roberts *et al.*, 1957). De acuerdo con datos de curadores de países latinoamericanos CIMMYT, MEXICO se reportan 27.763 accesiones de maíz, de las cuales alrededor de 16.380 están en Mesoamérica y entre 11.383 y 12.113 en Suramérica (Díaz, 1988).

En Colombia se tienen identificadas 23 razas de maíces, agrupadas en tres categorías en relación con su origen probable, reconocidas por Robert *et al.* (1957). Se definen como 'razas primitivas' (dos), 'razas probablemente introducidas' (nueve) y 'razas híbridas originadas en Colombia' (doce). Estos autores identificaron además, cuatro factores de evolución que contribuyeron a la formación de dichas razas en Colombia: (i) aislamiento geográfico, (ii) hibridación interracial, (iii) hibridación con maíces contaminados con teocintle procedentes de México e (iv) hibridación del maíz con su pariente silvestre *Tripsacum*.

Actualmente, factores como el cambio de uso del suelo en función del mercado, éxodos humanos debidos a fenómenos sociales y naturales, la ausencia de programas públicos de conservación *in situ*, y algunos relacionados con los procesos evolutivos propios de especies panmíticas como deriva genética, mutaciones o hibridación con materiales mejorados, pueden haber conducido a una redistribución geográfica o a la pérdida en su diversidad genética de las razas identificadas por Robert *et al.* (1957).

La pérdida de la diversidad genética, entendida como la pérdida de genes individuales, combinaciones de genes o de razas de especies vegetales o animales localmente adaptadas no se ha estudiado en las razas de maíz criollo e indígena en Colombia. Además, desde la década de los 50 hasta la fecha se han realizado pocos estudios sobre diversidad genética en maíz colombiano. Por ello, determinar la estructura poblacional e historia de los progenitores silvestres de plantas cultivadas es de gran importancia en la investigación, debido a que este conocimiento se necesita para diseñar estrategias de conservación y entender los procesos evolutivos que llevaron a la domesticación (Schaal y Olsen, 2000).

Con base en este planteamiento, se propone como objetivo principal un estudio molecular preliminar de la diversidad genética de las razas de maíces criollos e indígenas colombianos, a través de una región de ADN cloroplástico (ADNcp).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

- Estudiar, de forma preliminar, la diversidad genética de las razas de maíces criollos e indígenas colombianos mediante una herramienta molecular.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la diversidad genética de accesiones de las 23 razas criollas e indígenas colombianas de maíz, utilizando una región genómica de alto polimorfismo.
- Proponer grupos raciales de maíces, confrontándolo con los estudios de Roberts *et al.* (1957) y Cardona (2010).

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 Clasificación taxonómica del maíz

El maíz en su forma cultivada y sus parientes silvestres, los teocintles, se clasifican dentro del género *Zea*, familia Gramíneae o Poaceae, que incluye también a importantes cultivos agrícolas como el trigo, arroz, avena, sorgo, cebada y caña de azúcar (Bianchi *et al.*, 1989). Con base en caracteres de la espiga o inflorescencia masculina, el género se ha dividido en dos secciones (Doebley & Iltis, 1980). La sección *Luxuriantes* que agrupa cuatro especies, los teocintles perennes (*Z. diploperennis* y *Z. perennis*) y los anuales (*Z. luxurians* y *Z. nicaraguensis*) (Iltis & Benz, 2000), y la sección *Zea*, que se circunscribe a una sola especie (*Z. mays*) dividida en cuatro subespecies: el maíz (*Z. mays* subsp. *mays*) y los teocintles anuales (*Z. mays* subsp. *mexicana*, *Z. mays* subsp. *parviglumis* y *Z. mays* subsp. *huehuetenanguensis*) (Sánchez *et al.*, 1998) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz (Bianchi *et al.*, 1989).

Descriptor	Epíteto	Observación
Reino	Plantae	Seres orgánicos multicelulares con “habilidad” para generar sus propios nutrientes mediante la fotosíntesis.
División	Magnoliophyta	Árboles, arbustos o hierbas. Hojas caducas o persistentes, generalmente bien desarrolladas y diferenciadas en limbo y pecíolo. Flores hermafroditas o unisexuales, generalmente con periantio. Primordios seminales encerrados en carpelos. Semillas desarrolladas en el interior de un fruto.
Clase	Liliopsida	Clase que consiste en cerca de 60.000 especies de angiospermas. A menudo se refiere como las monocotiledóneas. Los primeros fósiles de monocotiledóneas son conocidos desde principios del Cretácico. Cinco subclases han sido reconocidas, aunque la clasificación ahora se está reorganizando.
Subclase	Commelinids	Nombre de un taxón asignado a la categoría taxonómica de clase, que en la clasificación de Cronquist 1981,6 1988,7 coincide con la circunscripción de las monocotiledóneas.
Orden	Poales	El orden Poales se caracteriza por presentar plantas herbáceas o un tanto leñosas. Poseen cristales de sílice en su epidermis. Las hojas son alternas o arrosadas, enteras, lineares y sin pecíolo pero con base envainadora y con lígula y nervaduras paralelinervias.
Familia	Poaceae	Origen etimológico del nombre de la familia. El nombre del género tipo, <i>Poa</i> , proviene de la palabra griega que define a los pastos o plantas de forraje.
Género	<i>Zea</i>	Género que comprende varias especies de gramíneas de origen americano, de las cuales la única que cuenta con valor económico es <i>Zea mays</i> ssp <i>mays</i>
Especie	<i>Zea mays</i> L.	

3.2 Diversidad racial del maíz

El desarrollo de las culturas de los diferentes pueblos americanos, sus migraciones, el descubrimiento de América y el subsiguiente movimiento de europeos, fueron factores decisivos en la creación de la diversidad del germoplasma de maíz (Goodman y Bird, 1977). Además, los continuos intercambios de genes entre las poblaciones, la posterior selección natural y humana, han mantenido activo el proceso de diversificación, mediante el cual se ha seleccionado y modificado características genotípicas de la planta, que le han permitido la formación de nuevas poblaciones adaptadas a diversos climas y tipos de suelos. De acuerdo con Sánchez *et al.* (2000), la interacción ambiente-genotipo y el aislamiento geográfico también favorecieron la distribución geográfica de nuevas variantes de maíz (diversificación).

Esta diversificación creó un problema de clasificación que se agudiza aún más en las especies alógamas como el maíz, en las que normalmente, se producen con cierta frecuencia cruzamientos intervarietales. Anderson y Cutler (1942), al proponer un estudio de la diversidad racial del maíz y efectuar una clasificación natural de la misma, introdujeron el concepto de raza como 'un conjunto de individuos con un número suficiente de caracteres en común que permita su reconocimiento como grupo'.

Siguiendo este criterio se iniciaron trabajos de recolección y clasificación racial, basándose en un gran número de caracteres morfológicos y de procedencia geográfica. Dichas colectas fueron promovidas por la Fundación Rockefeller, el National Research Council de EE.UU y las Agencias Nacionales de Agricultura de los diferentes países de Latinoamérica que participaron en las mismas.

Este gran esfuerzo se tradujo en más de 12000 colecciones, todas ellas están descritas en una serie denominada "Races of Maize Booklets" que comprende once monografías (Wellhausen *et al.*, 1952, 1957; Hatheway, 1957; Roberts *et al.*, 1957; Brieger *et al.*, 1958; Brown, 1960; Ramírez *et al.*, 1960; Grant *et al.*, 1963). Eliminando las duplicaciones, se considera que existen en el continente americano entre 220 y 300 razas de maíz (Vigouroux *et al.*, 2008).

3.3 Origen, evolución, domesticación y dispersión del maíz

El maíz se considera originario del continente americano (Ziegler, 2001) el centro de diversidad y origen del cultivo es México como el centro de diversidad y de origen del cultivo, y al teocintle (*Zea mays* ssp. mexicana) como el pariente silvestre más cercano, con el cual existe un constante flujo de genes (Wellhausen *et al.*, 1951). Generalmente se acepta su evolución a partir de la transformación de esta gramínea (Galinat, 1988), con un lapso de tiempo de unos 6.500 años (Sevilla y Holle, 2004).

Los Mayas domesticaron desde sus inicios esta planta en un proceso que condujo a la incapacidad de liberar por sí misma sus semillas para dispersarse (Galinat, 1979; (Figura 1). Llevado y plantado por el hombre durante sus viajes, y poseedor de un alto nivel de heterocigosidad, el maíz respondió a las presiones de selección ambiental y antrópica dando origen a diferentes razas geográficas adaptadas a disímiles condiciones de crecimiento (Galinat, 1979). En la actualidad se encuentra muy difundido por todo el mundo, especialmente en el continente europeo y en Estados Unidos, en donde se encuentra la mayor concentración comercial del cultivo (Paliwal, 2001).

Teorías sobre el origen del maíz

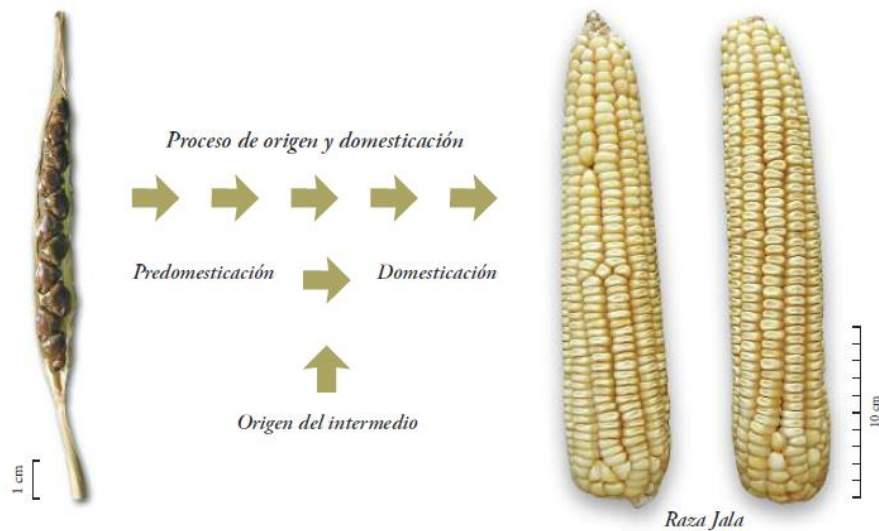


Foto: Taeko Angel Kato Yamakake

Figura 1. Esquema que muestra que el origen y domesticación de un cultivo es un proceso que consta de un sinnúmero de etapas que, a su vez, pueden agruparse en la predomesticación que origina a la planta intermedia y se inicia el proceso de domesticación (Kato, 2009).

En el proceso de dispersión y adaptación, el maíz divergió en cientos de formas raciales. Este extremo polimorfismo se origina desde el potencial para tal variación hallada en su ancestro, probablemente una forma diploide de teocintle perenne extinta. La base de la variación es el alto nivel de heterocigosidad y mutabilidad que está asociado a la constante fecundación cruzada (Galinat, 1979).

Bajo el punto de vista agronómico, siempre ha existido una gran variabilidad en la especie y pese a los programas de fitomejoramiento, ha sido muy poco lo que se

ha utilizado de la amplia variabilidad genética que posee esta especie (Vasal *et al.*, 1994). Los factores que contribuyen en la gran diversidad genética son selección, mutación, oscilación genética, migración e hibridación (Wellhausen *et al.*, 1951). La selección practicada por los indígenas y por las antiguas civilizaciones americanas fue primordial para el desarrollo de las diferentes razas de maíz, lo que se evidencia por las preferencias específicas de los diferentes grupos étnicos (Weatherwax, 1954).

La localización en el extremo noroeste de Suramérica, y la relación que ha tenido con la migración humana pre y post-colombina, han hecho de Colombia el cruce natural de caminos entre las Américas (Roberts *et al.*, 1957). Las culturas colombianas reflejan, históricamente, la posición marginal (de Colombia) respecto de los Andes Peruanos y a la América Central (Bennett, 1948). No es difícil advertir la influencia de la migración de tribus indígenas que pudieron llevar consigo los maíces colombianos (Roberts *et al.*, 1957).

3.4 Estudio citogenético del maíz

En el género *Zea*, *Z. mays mays*, *Z. mays mexicana*, *Z. mays parviglumis* y *Z. mays luxurians* (anuales) presentan $2n=2x=20$, mientras que *Z. mays diploperennis* (perenne) presenta $2n=4x=40$ cromosomas (Doebley e Iltis, 1980).

Las especies diploides del género *Zea* se cruzan libremente entre sí y sus híbridos son totalmente fértiles. Con el género *Tripsacum* existe alguna dificultad y sus híbridos F1 presentan fertilidad femenina parcial y andro-esterilidad total. Esto es debido a que el género *Tripsacum* y/o sus ancestros tienen un número básico cromosómico de $x=9$, difiriendo así del maíz y teocintle, los cuales tienen $x=10$ (Galinat, 1979).

3.5 Características morfológicas de la planta

La planta de maíz tropical es alta, con abundantes hojas y un sistema radical fibroso, normalmente con un solo tallo que tiene hasta 30 hojas. Algunas veces se desarrollan una o dos yemas laterales en la axila de las hojas en la mitad superior de la planta; estas terminan en una inflorescencia femenina la cual se desarrolla en una mazorca cubierta por hojas que la envuelven; esta es la parte de la planta que almacena reservas. La parte superior de la planta termina en una inflorescencia masculina o panoja; esta tiene una espiga central prominente y varias ramificaciones laterales con flores masculinas, todas las que producen abundantes granos de polen (Onderdonk y Ketcheson, 1972).

Su sistema radicular está conformado por raíces adventicias. Es el principal sistema de fijación de la planta, su principal función de estas raíces es mantener la planta erecta y evitar su vuelco, además absorbe agua y nutrientes (Mistrik y Mistrikova, 1995). Su tallo tiene tres componentes importantes en sus tejidos: la

corteza o epidermis, los haces vasculares y la médula. Los haces vasculares están ordenados en círculos concéntricos con una mayor densidad de haces y anillos más cercanos hacia la zona periférica epidérmica; su densidad se reduce hacia el centro del tallo. La mayor concentración de haces vasculares debajo de la epidermis proporciona al tallo resistencia contra el vuelco (Esaú, 1977).

El maíz es una planta monoica; desarrolla inflorescencias con flores de un solo sexo las que crecen siempre en lugares separados de la planta. La inflorescencia femenina o mazorca crece a partir de las yemas apicales en las axilas de las hojas y la inflorescencia masculina o panoja se desarrolla en el punto de crecimiento apical en el extremo superior de la planta (Dellaporta y Calderón Urrea, 1994). Los granos de polen del maíz son de una estructura trinuclear; tiene una célula vegetativa, dos gametos masculinos y numerosos granos de almidón; su gruesa pared tiene dos capas, la exina y la intina y es bastante resistente (Cheng y Pareddy, 1994).

El grano o fruto del maíz es un Cariópside que se caracteriza porque la pared del ovario o pericarpio está fundida con la cubierta de la semilla o testa y ambas están combinadas conjuntamente para conformar la pared del fruto. Consiste de tres partes principales: la pared, el embrión diploide y el endosperma triploide (Esaú, 1977).

3.6 Clasificación de las razas criollas en Colombia

En Colombia la diversificación del maíz tradicional es muy amplia, debido a las condiciones morfofísicas y la diversidad de características ambientales como altitud, temperatura, régimen de lluvia, suelo y otros factores, propiciaron el desarrollo de poblaciones genéticas que se distinguen entre sí y a las que se denominan razas (Roberts *et al*, 1957).

Roberts *et al.* (1957) al observar su gran estructura genética clasificaron las razas de maíz en tres categorías: dos primitivas (Pollo y Pira), nueve probablemente introducidas (Pira Naranja, Clavo, Güirúa, Maíz Dulce, Maíz Harinoso Dentado, Cariaco, Andaquí, Imbricado y Sabanero) y 12 híbridas colombianas (Cabuya, Montaña, Capiro, Amagaceño, Común, Yucatán, Cacao, Costeño, Negrito, Puya, Puya grande y Chococeño) (Tabla 2; Figura 2).

Tabla 2. Razas de maíz criollo e indígena y su distribución geográfica en Colombia (Roberts *et al.*, 1957).

Orden	Raza	Ubicación geográfica	Clasificación
1	Pollo	Boyacá y Cundinamarca	Primitivas
2	Pira	Cundinamarca, Tolima, Huila, Nariño y Valle del Cauca	
3	Pira	Nariño	Probablemente introducidas
	Naranja		
4	Clavo	Nariño, Tolima, Caldas, Norte de Santander y Chocó	
5	Güira	Magdalena	
6	Maíz Dulce	Nariño	
7	Maíz Harinoso Dentado	Cundinamarca, Nariño y Tolima	
8	Cariaco	Costa Atlántica y valles de los ríos Cauca y Magdalena	
9	Andaquí	Meta y valle del alto Magdalena	
10	Imbricado	Nariño	
11	Sabanero	Cordillera oriental	
12	Cabuya	Cordillera oriental	Híbridas
13	Montaña	Cordillera central especialmente en Antioquia y Nariño	
14	Capio	Cordillera central especialmente en Antioquia y Nariño	
15	Amagaceño	Zonas frías de las tres cordilleras especialmente en los departamentos de Nariño, Cauca, Valle, Huila, Caldas, Antioquia, Cundinamarca, Boyacá, Chocó y Santander	
16	Común	Valles de los ríos Magdalena y Cauca	
17	Yucatán	Valle del alto Magdalena especialmente entre los departamentos de Cundinamarca y Tolima	
18	Cacao	Santanderes, Cundinamarca y Boyacá	
19	Costeño	Costa Atlántica	
20	Negrito	Atlántico y Magdalena	
21	Puya	Vertiente oriente del río Magdalena, y norte del país hasta la península de la Guajira	
22	Puya Grande	Norte de Santander y frontera con Venezuela	
23	Chococeño	Costa Pacífica de Colombia	

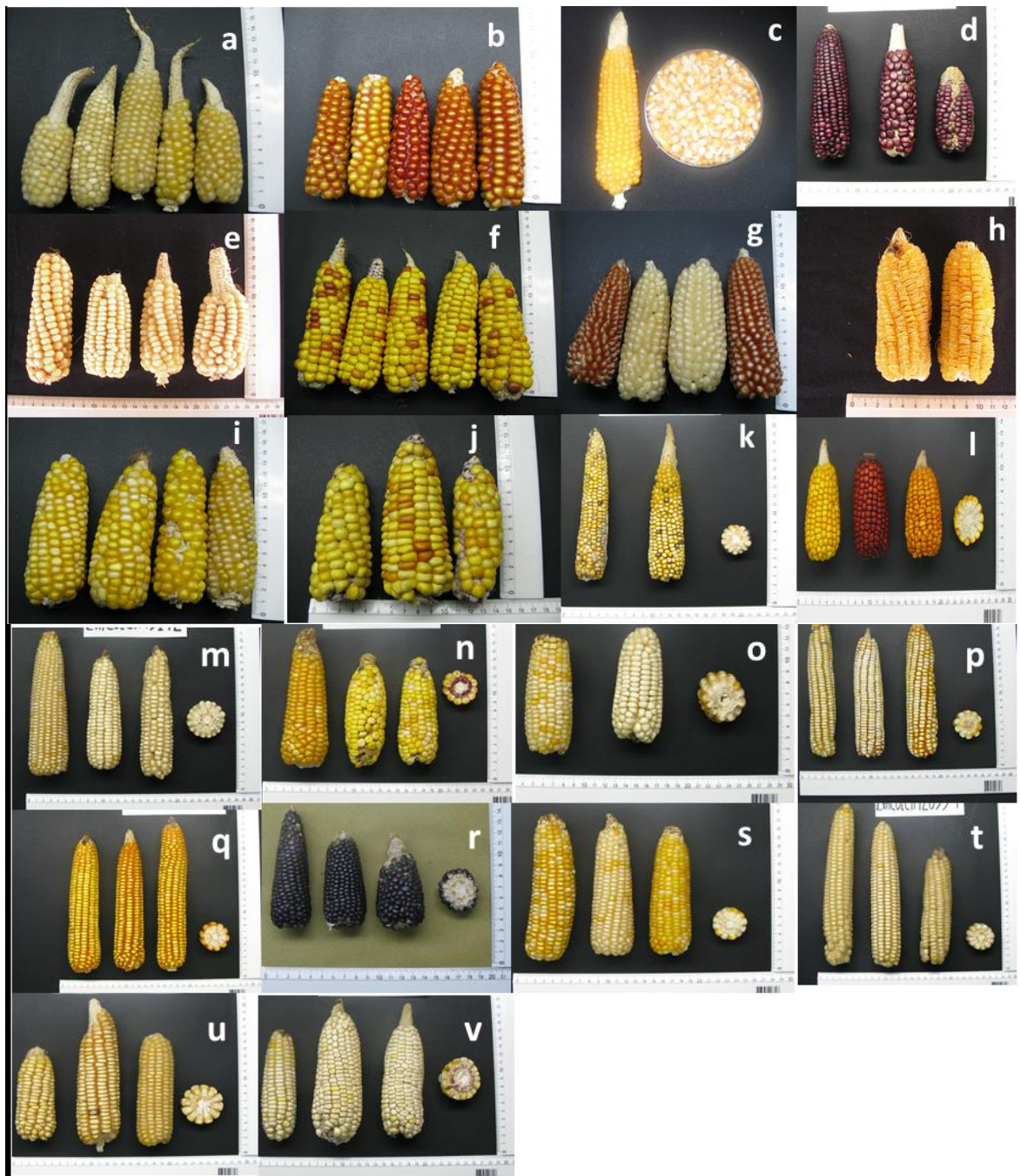


Foto. Autor.

Figura 2. Razas de maíz criollo e indígena en Colombia (Roberts *et al.*, 1957). A: Pira; B: Pollo; C: Pira naranja; D: Negro; E: Amagaceño; F: Cabuya; G: Imbricado; H: Maíz dulce; I: Montaña; J: Sabanero; K: Guirúa; L: Cariaco; M: Común; N: Cacao; O: Costeño; P: Puya; Q: Puya grande; R: Chococeño; S: Andaquí; T: Clavo; U: Yucatán; V: Maíz harinoso dentado.

3.7 Importancia del maíz

Desde la época precolombina los antiguos pobladores hacían uso del teocintle y el maíz de los que tal vez se bebía el jugo dulce de la caña. Por selección humana, se llegó a producir un maíz primitivo, que se consumía de diversas maneras. Una de ellas era sencillamente calentarlo hasta que la semilla explotara en la forma que hoy conocemos como “palomita de maíz” es probable que también se moliera hasta producir harina. Sin duda, el proceso de nixtamalización para la elaboración de la masa para tortillas y tamales es uno de los grandes logros de las culturas mesoamericanas, al favorecer la biodisposición del calcio, aminoácidos y la niacina (Vargas, 2007).

Los granos, las hojas, los tallos, las espigas del maíz, se utilizan con diferentes propósitos. Todas las partes de la planta, incluyendo raíces y horcones, sirven como abono o combustible. La caña se utiliza en la construcción como también en el tallado de bellas figuras (incluyendo algunos Cristos presentes en iglesias), se le utiliza como medicina, ha servido de envoltura, abono, combustible, bebida refrescante o embriagante. El maíz también se emplea con propósitos medicinales, para curar diversos males del cuerpo y del alma. En fin, sus usos tradicionales parecerían infinitos (Esteva, 2003)

3.8 Valor nutricional del maíz

Las partes principales del grano de maíz difieren considerablemente en su composición química. La cubierta seminal o pericarpio se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente el 87%, la que a su vez está formada fundamentalmente por hemicelulosa (67%), celulosa (23%) y lignina (0,1%). El endospermo, en cambio, contiene un nivel elevado de almidón (87%), aproximadamente 8% de proteínas y un contenido de grasas crudas relativamente bajo. Por último, el germen se caracteriza por un elevado contenido de grasas crudas, el 33% por término medio, y contiene también un nivel relativamente elevado de proteínas (próximo al 20%) y minerales (Burga y Duensing, 1989) (Tabla 3).

Tabla 3. Composición química proximal de las partes principales de los granos de maíz.

Componente químico	Pericarpio	Endospermo	Germen
	%	%	%
Proteínas	3,7	8,0	18,4
Extracto etéreo	1,0	0,8	33,2
Fibra cruda	86,7	2,7	8,8
Cenizas	0,8	0,3	10,5
Almidón	7,3	87,6	8,3
Azúcar	0,34	0,62	10,8

3.9 Principales productores de maíz

La producción a nivel mundial alcanzó una cifra de 839,68 millones de (Ton) en el año 2012 con una participación del 68.6% de la producción total de cereales. El maíz se cultiva en más de 50 países tanto individual como industrialmente. Entre los 10 principales países productores se encuentran EE.UU con 272.4 millones de Ton, seguido por China 200 millones de Ton, Brasil 70 millones de Ton, la Unión Europea (27 estados) 54.64 millones de Ton, Argentina 28 millones de Ton, Ucrania 21 millones de Ton, México 20.7 millones de Ton, India 20 millones de Ton, Sudáfrica 13 millones de y Canadá 11.6 millones de Ton (Agropanorama, 2013) (Figura 3).

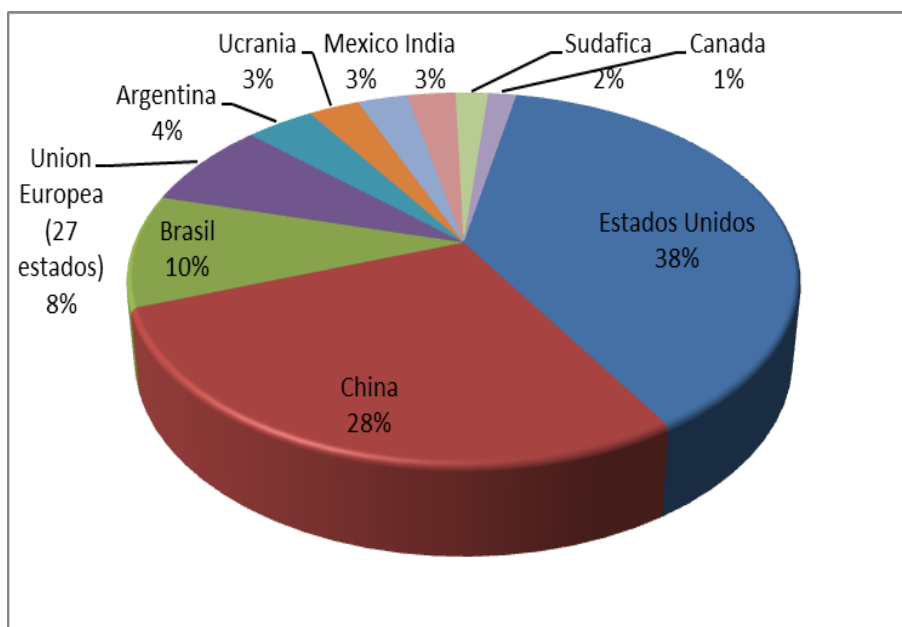


Figura 3. Diez principales países productores a nivel mundial, ordenados de mayor a menor.

La producción nacional de maíz se divide entre el maíz cultivado de forma tradicional y el tecnificado. El tradicional continúa ocupando la mayoría del área cultivada, 429.997 has., (73% en 2008) pese a haberse reducido el área cosechada luego de la apertura en 1991. Este maíz tiene una baja productividad que se ha incrementado levemente desde 1987 y se halla ligeramente por encima de 1.5 ton/ha. Por otro lado, el maíz tecnificado ha venido ganando participación en la producción nacional gracias a un incremento tanto del área cosechada (alrededor de 200.000 has.) como de los rendimientos que son casi tres veces mayores que los del maíz tradicional. Recientemente la producción de maíz tecnificado ha sobrepasado la producción de maíz tradicional.

Este proceso de modernización del cultivo de maíz no ha generado un incremento importante en la producción total nacional, pero si ha implicado una redistribución geográfica de ésta.

Actualmente los principales departamentos productores de maíz en Colombia son Córdoba, Valle del Cauca, Bolívar, Cesar y Meta, entre otros. Para 2008 sus producciones ascendieron al 50% del total de la producción nacional, Córdoba (20%), Bolívar (12%), Valle del Cauca (11%), Cesar (10%) y Meta (10%), Antioquia (9%), Huila (8%), Tolima (8%), Sucre (7%) y Santander (5%) . Leibovich J. et al (2010). (Figura 4).

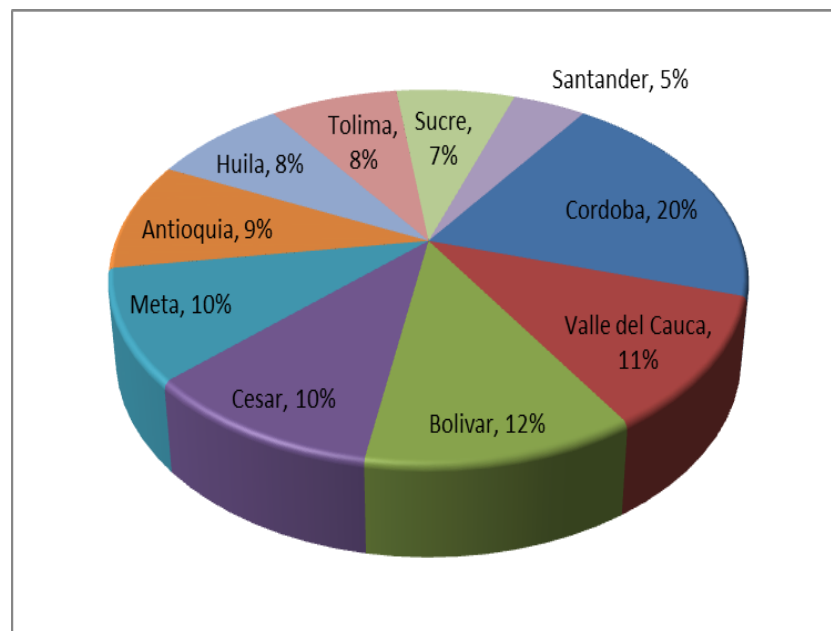


Figura 4. Diez principales departamentos productores en Colombia, ordenados de mayor a menor

3.10 Diversidad genética

La variabilidad genética es un componente básico de la biodiversidad y su trascendencia es bien conocida en el campo de las plantas cultivadas. Desde los comienzos de la agricultura, jugó un papel relevante en los procesos de mejoramiento genético. En los últimos años, los intereses siguen centrados en la diversidad genética y su conservación de la información genética originales (Vallejo y Estrada 2002).

El maíz posee una gran diversidad genética, la cual se refleja en sus múltiples parientes morfológicas de la planta, mazorca y grano su amplia adaptación a gran número de ambientes y además, por sus diversos usos como alimento humano o animal, así como la gran variedad de productos que se obtienen de esta especie

(Paliwal, 2001). Sin embargo, la destrucción o modificación de los centros de origen de los cultivos, y el continuo desplazamiento de variedades tradicionales y razas locales por variedades modernas que poseen características como uniformidad, como respuesta a una creciente presión de mercado para producir nuevas variedades con altas producciones reduciendo así su base genética. Además, estos factores condicionan a presiones de plagas, enfermedades y cambios climáticos. (Hidalgo, 2004).

En este sentido es importante, la conservación de la información genética para tener la disponibilidad de obtener la variabilidad genética de especies de importancia socio-económica actual y potencial para su uso en programas de mejoramiento genético.

3.11 Análisis moleculares en maíz

Pocos análisis moleculares se han hecho utilizando secuencias de ADN pero si se han hecho utilizando marcadores RAPD (random amplified polymorphic DNA). Para el análisis de la diversidad genética, Peñaranda *et al.* (2005) realizaron una caracterización molecular de 22 accesiones criollas colombianas de maíz para determinar contenidos de aceite en grano, realizando extracción y amplificación del ADN, utilizando un grupo de marcadores de tipo SSR.

De igual forma, Domanico (2004) realizó una caracterización y clasificación de híbridos simples de maíz con marcadores SSRs con el propósito de caracterizarlos genéticamente y determinar las distancias genéticas entre ellos, mediante marcadores moleculares SSRs. Lino (2002) realizó una caracterización genotípica de plantas de maíz utilizando secuencias microsatélites con el propósito de asignar líneas de maíz a grupos heteróticos.

3.12 Aislamiento del ADN

En el mercado existe gran variedad de protocolos eficientes y convencionales que permiten el aislamiento de ADN de manera fácil y en poco tiempo (Brusés *et al.*, 2000). Muchas de estas han sido útiles en muchas especies; por mencionar algunos métodos “clásicos”, se encuentran los descritos por Doyle y Doyle (1987) útiles en hojas maduras, independientemente de las condiciones de crecimiento y edad.

Uno muy utilizado es el protocolo a base de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio), muy eficiente debido a que se pega fuertemente al ADN, desplaza las proteínas, previene la degradación y solubiliza muchos polisacáridos. Además, funciona como detergente que destruye las membranas al momento de moler el material vegetal (Csai *et al.*, 1998) y se remueve mediante extracciones con cloroformo (Valadez y Kalh, 2000).

El método de Dellaporta *et al.* (1983) se ha usado en especies difíciles para el aislamiento de ADN, como es el caso de las especies boscosas entre otros, debido a sus altos niveles de polisacáridos y muchos tipos de metabolitos secundarios.

Por último, para la eliminación de contaminantes por RNA, es necesaria la adición de RNasa e incubación al final de la extracción, a diferente concentración y temperatura dependiendo del método a utilizar (Csaikl *et al.*, 1998).

3.13 Marcadores cloroplásticos ADNcp

Los marcadores moleculares son biomoléculas asociadas a un rasgo genético, y normalmente se trata de rasgos no evidenciados fenotípicamente, ya sean proteínas o bien fragmentos de ADN. Presentan una serie de ventajas como el no ser afectados por variaciones ambientales ni de desarrollo, muestran la base misma de la variación de los individuos, permitiendo seleccionar regiones concretas dentro de la molécula de ADN para estudios determinados, siendo el número de polimorfismos detectables teóricamente ilimitado, permitiendo analizar tanto la información que se expresa como la que no, empleándose a la fecha un gran número de técnicas (Muñoz *et al.* 2011).

El ADN cloroplástico es una molécula circular que se encuentra en múltiples copias en el cloroplasto y contiene secuencias codificantes (genes) y no codificantes (intrones y espaciadores intergénicos). La presencia de múltiples copias del genoma cloroplástico, junto con la presencia de múltiples cloroplastos por célula, significa que el ADNcp es muy abundante en una extracción típica de ADN. Lo anterior facilita la obtención de un alto número de copias en el análisis de fragmentos de restricción, así como las amplificaciones por PCR de regiones específicas del ADNcp (Flórez, 2009).

Las secuencias codificantes han sido usados exitosamente a nivel de familia y niveles superiores, mientras que las regiones no codificantes de ADNcp como intrones (p.ej. *rpL16*, *rpoC*, *rpS16*, *trnL*, *trnK*) y espaciadores intergénicos (*trnT-trnL*, *trnL-trnF*, *atpB-rbcL*, *psbA-trnH*) son usados a niveles taxonómicos inferiores a familia ofreciendo caracteres potencialmente informativos para los objetivos propuestos (Flórez, 2009).

4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Localización

La producción de plántulas de la colección de la especie *Zea mays* se realizó en la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, en el Laboratorio de Citogenética y el estudio molecular, en el Laboratorio de Biología Molecular de la misma sede.

4.2 Material biológico

Se utilizaron 1 accesión de cada una de las 23 introducciones de maíz (Tabla 4) las cuales se encuentran en la colección de trabajo del Grupo de investigación en Recursos Fitogenéticos Neotropicales (GIRFIN) de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, las cuales corresponden a las 23 razas caracterizadas por Roberts y colaboradores en la década del 50 en el territorio colombiano. Las semillas provienen de esas colecciones, y se encontraban almacenadas en el banco de germoplasma de CIMMYT, en México. Se seleccionaron los materiales más representativos de cada raza.

Tabla 4. Introducciones de *Zea mays* L. de GIRFIN/UNAL Palmira a evaluar.

Orden	Entrada	Código	Departamento	Municipio	Raza o nombre común
8	35	ZmColCIM20524	Putumayo	Puerto Leguizamó	Andaquí
9	60	ZmColCIM20559	Tolima	San Luis	Clavo
10	57	ZmColCIM20566	Tolima	Las Piedras	Yucatán
11	65	ZmColCIM21636	Cundinamarca	La Palma	Harinoso
13	1	ZmColCIM3108	Cundinamarca	Ubaté	Pira
14	11	ZmColCIM3112	Nariño	Buesaco	Pira Naranja
16	62	ZmColCIM3121	Magdalena		Güirúa
17	7	ZmColCIM3127	Nariño	Tangua	Maíz dulce
18	39	ZmColCIM3131	Córdoba	Montería	Cariaco
20	6	ZmColCIM3140	Sabana de bgta		Imbricado
21	4	ZmColCIM3153	N. de S.	Pamplona	Cabuya
22	9	ZmColCIM3155	Antioquia	La Ceja	Montaña
23	55	ZmColCIM3164	Cauca	Popayán	Amagaceño
24	75	ZmColCIM3172	Valle	Pradera	Común
26	58	ZmColCIM3185	Santander	Charalá	Cacao
27	16	ZmColCIM3187	N. de S.	Mutiscua	Sabanero
29	51	ZmColCIM3194	Atlántico	Campo de la Cruz	Costeño
30	28	ZmColCIM3199	Magdalena	Magdalena	Negrito
31	63	ZmColCIM3203	Magdalena	Aguachica	Puya
33	34	ZmColCIM3208	N. de S.	Salazar	Puyagrande

36	44	ZmColCIM3219	Chocó	Infiernito-Rio Nauca	Chococeño
42	55	ZmcolCim3106	Cundinamarca	Zipaquira	Pollo
54	175	ZmColPut007	Putumayo	Sibundoy	Maíz Capio

4.3 Germinación del material

Se utilizaron 20 semillas por material, las cuales se colocaron a germinar. De las hojas jóvenes, poco desarrolladas ('hoja bandera' o 'cigarro') se extrajo el ADN (Figura 5).



Figura 5. A: Selección de los individuos; B: Selección y limpieza de las semillas; C: Establecimiento e Identificación de los individuos para su germinación en papel toalla y agua; D y E: Material vivo para su extracción de ADN genómico.

4.4 Extracción de ADN

Se realizaron pruebas preliminares para determinar que protocolo o método ofrecía mayor cantidad de ADN total, con el propósito de estandarizar el proceso de extracción, realizar la amplificación por medio de la PCR (Reacción en Cadena

de la Polimerasa) y evaluar los cebadores a utilizar. Entre los métodos ensayados están el de Dellaporta *et al.* (1983) modificado por el Laboratorio de Biología Molecular UNAL Sede Palmira; el protocolo del Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT; el método de; el método de Fulton *et al.* (1995) y el KIT dNTPs Promega de extracción de ADN para plantas.

4.5 Cuantificación del ADN

Para evaluar la cantidad y calidad del AD, se prepararon geles de agarosa al 0,8% corridos en tampón TBE 0.5X (Tris-borato 0045M; EDTA 0.001M) y teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 ng/ml. Las concentraciones se determinaron por comparación de concentraciones de ADN del bacteriófago lambda a 30 60 y 90 ng/ul. Se efectuó una base de datos computarizada donde se registró la mayor cantidad de información disponible.

4.6 Amplificación del ADN mediante PCR

En la Tabla 5 se observa la concentración del coctel base estándar. Para la estandarización de las condiciones de cada uno de los marcadores. Se preparó una mezcla de reactivos en un tubo estéril de microcentrífuga (1.5 ml) para un volumen final de 25 µl. Se utilizaron 2 µl de ADN genómico a 50 ng/ul para la PCR con concentraciones finales de tampón taq 1X, dNTPs 0,2 mM, Cebador F Y R 0,1uM, MgCl₂ de 3 mM, y 2,5 unidades de Taq polimerasa.

Tabla 5. Volumen de los cocteles para PCR.

Muestra	[] inicial	[] final	Volumen ul	Total ul * n
TAQ	5u / ul	1,25 mM	0.25	2.5
dNTP's	1,25 mM	0.2 mM	4	40
MgCL ₂	25 mM	3 mM	3	30
Cebador F	10uM	0,1 uM	0.25	2.5
Cebador R	10uM	0,1 uM	0.25	2.5
BUFFER TAQ	10X	1X	2.5	25
H ₂ O			13.75	137.5
DNA	10 - 100 ng/ ul	10 - 100 ng/ ul	1	
VOL TOTAL			25	240

TAQ = *Thermus aquaticus* (polimerasa Taq), dNTPs= desoxirribonucleótidos trifosfato
MgCl₂= Cloruro de magnesio Cebador F: Forwards. R: reverse

Para la amplificación de los 14 cebadores utilizados en el estudio, se manejó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Tabla 6).

Tabla 6. Marcadores explorados en el estudio.

Orden	Cebadores	Secuencia (5 'a 3')	Fuente
1	rpS16x2F2 trnK(UUU)	AAA GTG GGT TTT TAT GAT CC TTA AAA GCC GAG TAC TCT ACC	Shaw <i>et al.</i> 2007
2	psbA3'f trnHf	GTTATGCATGAACGTAATGCTC CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC	Kress <i>et al.</i> 2005
3	trnL(UAG) rpL32-F	CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT CAG TTC CAA AAA AAC GTA	Shaw <i>et al.</i> 2007
4	rbcLa_rev rbcLa_for	GTA AAA TCA AGT CCA CCY CG ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC	Kress <i>et al.</i> 2005
5	ITS4 ITS5A	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC CCT TAT CAT TTA GAG GAA GGA G	Whithe <i>et al.</i> 1990
6	Adhc-P1 Adhc-P2	CTGCKGTKGCATGGGARGCAGGGAAGCC GCA CAG CCA CAC CCC AAC CCT G	Small <i>et al.</i> 1998
7	GPDx7F 3 GPDx9R 3	GATAGATTTGGAATTGTTGAGG AAGCAATTCCAGCCTTGG	Strand <i>et al.</i> 1997
8	trnQ(UUG) rpS16x1	GCG TGG CCA AGY GGT AAG GC GTT GCT TTY TAC CAC ATC GTT T	Shaw <i>et al.</i> 2007
9	TabC TabF	AAT TAG CGA CGG ACG CTA CG ATT ACT TGA GCA AG ACG GGT	Taberlet <i>et al.</i> (1991)
10	rpL32-R: ndhF:	CCA ATA TCC CTT YYT TTT CCA A GAA AGG TAT KAT CCA YGM ATA TT	Shaw <i>et al.</i> 2007
11	nad1-BF2 nad1-BF3	GGAGGCAAGAACCATGCTTTCA GAAAGGGCTGTAGGTGATGGTG	
12	trnG2G-F trnG-R	GCG GGTATA GTT TAG TGG TAA AA GTA GCG GGA ATC GAA CCC GCA TC	
13	atpB-1: rbcL-1	ACATCKARTACKGGACCAATAA AACACCAGCTTTTRAATCCAA	
14	TabE TabF	GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC ATT ACT TGA GCA AG ACG GGT	

4.7 Visualización de los productos PCR

Para la visualización de los productos PCR bajo luz ultravioleta, se utilizó gel de agarosa a una concentración de 1.2% teñido con bromuro de etidio, en una cámara de electroforesis para gel horizontal CBS Scientific SGE-020-02 y un equipo digital de captura de imagen marca UVITEC.

Se preparó el soporte del gel utilizando cinta adhesiva, sellando los lados abiertos con refuerzos en los márgenes inferiores y las esquinas del soporte del gel. Se adicionó 1,2 g de agarosa por 150ml de volumen de TBE 0,5X requerido. Se llevó al microondas hasta que la solución queda disuelta completamente y se agrega (1µl) de bromuro de etidio por cada 100ml de solución de agarosa preparada. Se dejó enfriar hasta que polimerizará en la cabina extractora de gases hasta

alcanzar la polimerización. Se adicionó la mezcla DNA+buffer de corrida dentro de los pozos del gel sumergidos en la cámara de electroforesis, usando la micropipeta. Se corrió la electroforesis por 40 minutos a 80 voltios. Finalmente, se observaron las bandas en un fotodocumentador con luz ultravioleta UV y se fotografió las bandas de ácidos nucleicos excitadas por el bromuro de etidio.

4.8 Secuenciación

La secuenciación de ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN. La secuencia de ADN constituye la información genética heredable del núcleo celular, los plásmidos, la mitocondria y cloroplastos (En plantas) que forman la base de los programas de desarrollo de los seres vivos.

Para solicitar el servicio de secuenciación a MACROGEN Inc. (Korea), la empresa dispone de una página Web que garantiza la trazabilidad de las muestras y permite el acceso on-line del usuario a los resultados.

4.9 Análisis bioinformático de datos

Las secuencias fueron editadas y ensambladas con el programa BioEdit 7.1.0: el cual es un software para Windows 95/98. Se identificaron errores en las secuencias bases, observados a partir de los electroferogramas (ver anexos). Cada región de DNA evaluado fue alineado usando el programa ClustalW versión 1.81, con los parámetros estándar de Larkin *et al.*, (2007) y los alineamientos modificados manualmente fueron realizados con EditPlus Text Editor versión 3.20 para Windows 7/vista/2000/2003/XP. Para la identificación de bloques no informativos y regiones divergentes del alineamiento, se utilizó el programa Gblock 0.91b 8 (Castresana, 2000). Cada una de las secuencias fueron revisadas en la base de datos NCBI usando el algoritmo BLASTn para estimar el score (puntuación) y confirmar la especie en estudio.

Para la evaluación de los marcadores, se usaron cinco criterios de identificación. 1º. Se identificó los marcadores con un grado de facilidad en su amplificación y se seleccionaron cinco individuos por marcador para evaluar la calidad de las secuencias.

2º. Se calculó para cada loci el número de haplotipos, número de sitios polimórficos y la diversidad haplotípica de Nei (Nei, 1973), con el soporte del programa DNAsp (Rozas y Rozas, 1999).

3º. Se evaluaron los modelos de sustitución nucleotídica a partir de los individuos que representan las razas criollas de maíz colombianas, con el objetivo de describir la consanguinidad existente.

4°. El mejor marcador con la capacidad de discriminar a nivel de grupo racial, se construyó un árbol de distancia genética, con el apoyo del programa MEGA versión 5 (Tamura *et al.*, 2011).

5°. Finalmente, el marcador seleccionado como altamente informativo, se evaluó con todas las secuencias para observar su eficiencia en la discriminación a nivel de especies y grupo racial.

El valor de Bootstrap de apoyo (BS) para cada clado individual se calculó mediante la ejecución de 500 replicaciones en el arranque de los datos. Todas las posiciones que contenían gaps o datos faltantes fueron eliminadas de la base de datos (Figura 6). A Figura 6 resume la metodología empleada.

Figura 6. Diagrama resumido de la metodología utilizada en la investigación.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Origen geográfico de las introducciones caracterizadas

Uno de los problemas más frecuentes en las colecciones de campo se relaciona con el insuficiente número de datos de pasaporte que acompañan las introducciones (Painting *et al.*, 1993). No contar con dicha información provoca un uso ineficiente de los recursos naturales y disminuye la posibilidad de utilizar inmediatamente el potencial de las introducciones. Una información precisa y detallada por introducción, permite utilizarlos en futuros trabajos en diferentes áreas de las Ciencias Biológicas (Tabla 7).

Tabla 7. Datos de pasaporte de las introducciones de Maíz (*Zea maíz* L.), utilizadas en el estudio.

Orden	Código	Departamento	Municipio	Raza	Latitud	Longitud	Altitud
8	ZmColCIM20524	Putumayo	Puerto Leguízamo	Andaquí	0,12	-74,46	185
9	ZmColCIM20559	Tolima	San Luis	Clavo	4,0721	-75,0517	435
10	ZmColCIM20566	Tolima	Las Piedras	Yucatán	4,3244	-74,5243	387
11	ZmColCIM21636	Cundinamarca	La Palma	Harinoso	5,2152	-74,24	1549
13	ZmColCIM3108	Cundinamarca	Ubaté	Pira	5,19	-73,49	2377
14	ZmColCIM3112	Nariño	Buesaco	Pira Naranja	1,23	-77,09	1646
16	ZmColCIM3121	Magdalena		Güira	10,5424	-74,0247	1397
17	ZmColCIM3127	Nariño	Tangua	Maíz dulce	1,0552	-77,2313	2515
18	ZmColCIM3131	Córdoba	Montería	Cariaco	8,43	-75,53	17
20	ZmColCIM3140	Sabana de bgta		Imbricado			
21	ZmColCIM3153	N. de S.	Pamplona	Cabuya	7,2229	-72,3915	2378
22	ZmColCIM3155	Antioquia	La Ceja	Montaña	6,0208	-75,2557	2144
23	ZmColCIM3164	Cauca	Popayán	Amagaceño	2,27	-76,36	1609
24	ZmColCIM3172	Valle	Pradera	Común	3,25	-76,15	1043
26	ZmColCIM3185	Santander	Charalá	Cacao	6,1702	-73,0905	1251
27	ZmColCIM3187	N. de S.	Mutiscua	Sabanero	7,1748	-72,4447	2709
29	ZmColCIM3194	Atlántico	Campo de la Cruz	Costeño	10,2244	-74,521	9
30	ZmColCIM3199	Magdalena	Magdalena	Negrito	11,3048	-72,5203	8
31	ZmColCIM3203	Magdalena	Aguachica	Puya	8,19	-73,38	125
33	ZmColCIM3208	N. de S.	Salazar	Puyagrande	7,4705	-73	796
36	ZmColCIM3219	Chocó	Infiernito-Rio Nauca	Chococeño	5,3614	-77,0058	37
42	ZmColCIM3106	Cundinamarca	Zipaquirá	Pollo	5	-74	2570
54	ZmColPut007	Putumayo	Sibundoy	Maíz Capiro	1,10365	-78,54536	2096

Con las coordenadas geográficas se construyó un mapa, mostrando la distribución de los materiales utilizados en el presente estudio. Se puede observar la amplia distribución de la especie en nuestro territorio, en diversos climas y alturas, concordando con el trabajo de (Roberts *et al.*, 1957) (Figura 7).

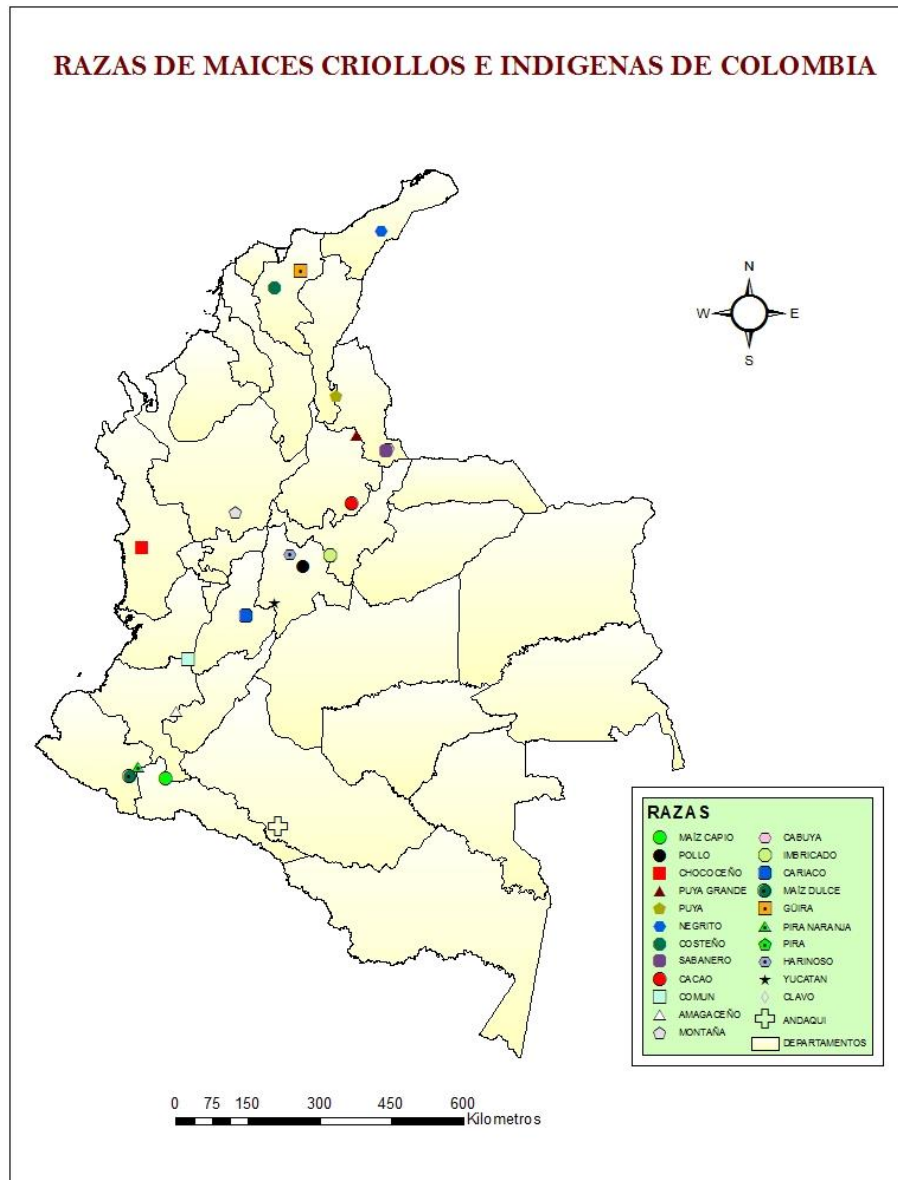


Figura 7. Mapa de distribución geográfica de las 23 razas criollas en Colombia, Capio, Pollo Chococoño, Puya Grande, Costeño, Sabanero, Cacao, Común, Amagaceño, Montaña, Cabuya, Imbricado, Yucatán, Cariaco, Maíz, Dulce, Güira, Pira Naranja, Pira, Harinoso Dentado, Clavo, Andaquí y Negrito, caracterizadas por Roberts *et al.* (1957).

5.2 Banco de ADN

Entre los métodos ensayados para la extracción de ADN en maíz, el protocolo de Doyle y Doyle (1987) modificado por CIMMYT (2006), fue el que permitió extraer ADN de buena calidad, con una concentración promedio de 50ng/ul en todas las introducciones evaluadas (Figura 8). Esto coincide con lo reportado por Weir *et al.* (1996). Wang *et al.* (1993), Henry (1997), Jewit *et al.* (1998) entre otros, que han utilizado CTAB para aislamiento de ADN de hojas maduras para estudios de caracterización de especies con la técnica RAPD (ADN Polimórfico Amplificado Aleatoriamente).

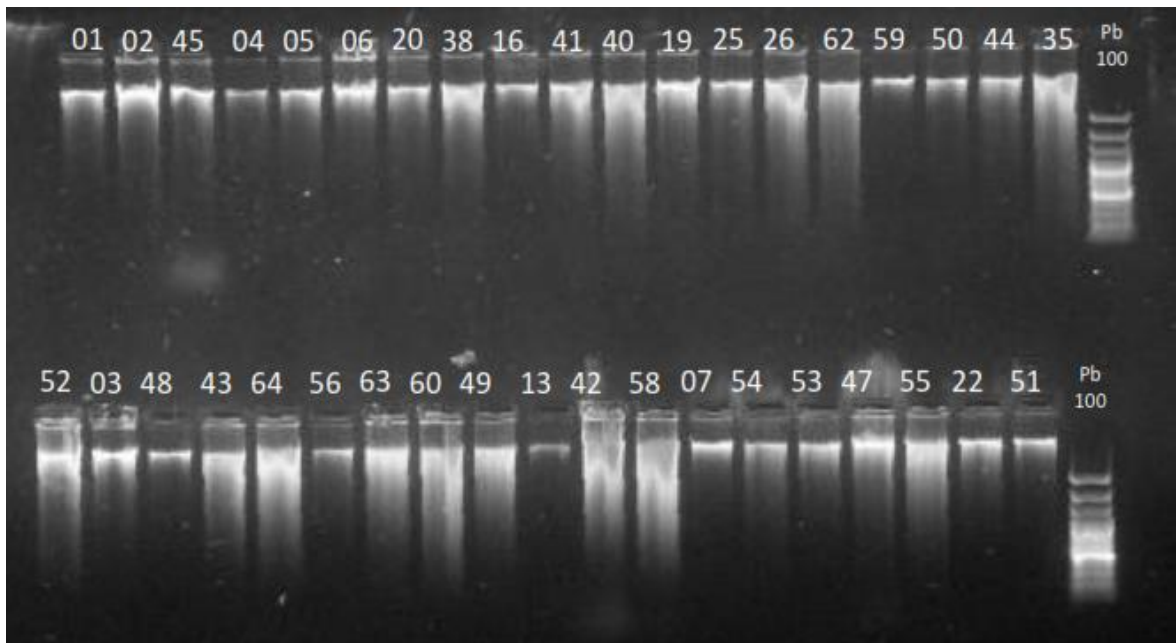


Figura 8. Muestras de ADN en gel de agarosa al 0.8% mediante el protocolo de Doyle y Doyle (1987) modificado por CIMMYT (2006).

5.3 Tasa de éxito en la amplificación por PCR

La tasa de éxito en la amplificación por PCR de los cebadores mostró que seis de ellos presentaron problemas en su amplificación y no fueron tomados en cuenta para el estudio (Tabla 8). Estos incluyen *ITS4-ITS5A*, *Adhc-P1-Adhc-P2*, *GPDx7F-GPDx9R*, *TabC-TabF*, *rpL32-R-ndhF* y *nad1-BF2-nad1-BF3*. El cebador *atpB-1-rbcL-1* amplificó 22 individuos de las 23 introducciones del estudio, sin embargo se incluyó en el estudio preliminar de amplificación. Se observó que el 57% de los pares de cebadores evaluados produjeron productos de amplificación. Esto significa que la secuencia de iniciadores explorados en el estudio son adecuados para su amplificación (Figura 9).

Tabla 8. Regiones exploradas para maíz en el presente estudio.

Orden	Cebador	Amplificaciones exitosas	Útil
1	rpS16x2F2- trnK(UUU)x1	23/23	si
2	psbA3'f- trnHf	23/23	si
3	trnL(UAG)- rpL32-F	23/23	si
4	rbcLa- rbcLb	23/23	si
5	ITS4- ITS5A	0/22	no
6	Adhc-P1- Adhc-P2	0/22	no
7	GPDx7F 3- GPDx9R 3	0/22	no
8	trnQ(UUG)- rpS16x1	23/23	si
9	TabC- TabF	0/22	no
10	rpL32-R:- ndhF:	0/22	no
11	nad1-BF2- nad1-BF3	0/22	no
12	trnG2G-F- trnG-R	23/23	si
13	atpB-1- rbcL-1	22/23	si
14	TabE- TabF	23/23	si

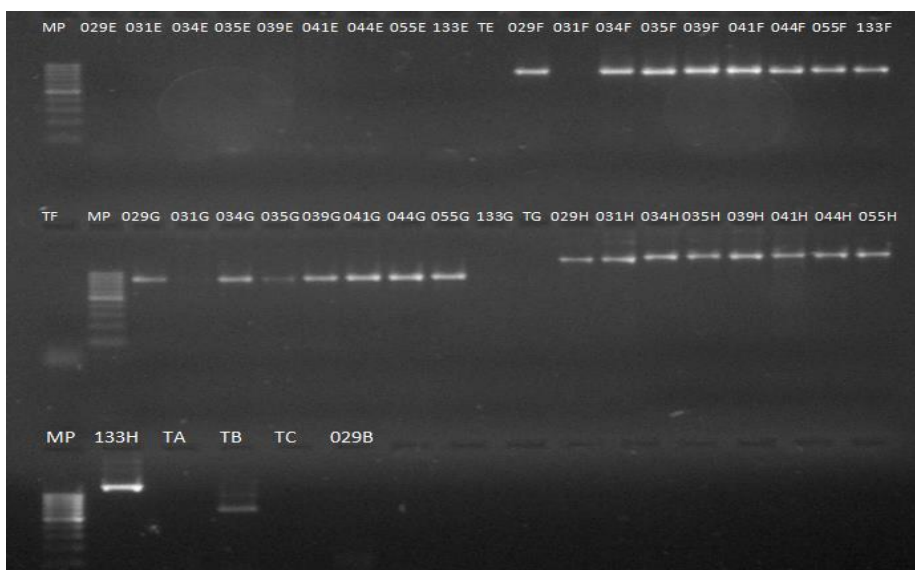


Figura 9. Resolución electroforética de los productos amplificados con los pares de primer evaluados en este estudio.

5.4 Prueba preliminar de variación de secuencias

Se realizó una prueba preliminar enviando a secuenciar cinco introducciones por cebador amplificado en el estudio (Tabla 9). Fueron seleccionadas en base a su diversidad genética y geográfica. Las introducciones utilizadas en esta prueba fueron: 54ZmCapiro, 21ZmCabuya, ZmMontaña, ZmAmagaceño y ZmPollo. Se observa que el marcador atpB1-rbcL1 tiene el mayor número de sitios polimórficos con 182, siendo el más informativo entre los marcadores evaluados. Posteriormente, este par de cebadores se evaluó en las veinte y tres accesiones utilizadas en este estudio (Tabla 9).

Tabla 9. Estadística descriptiva para los ocho cebadores evaluados en *Z. mays*.

Orden	Cebador	S	Hd
1	rpS16x2F2 trnK(UUU)x1	14	0,972
2	psbA3'f trnHf	12	0,83
3	trnL(UAG) rpL32-F	33	0,72
4	rbcLa_rev rbcLa_for	15	0,66
8	trnQ(UUG) rpS16x1	19	0,86
12	trnG2G-F trnG-R	4	0.400
13	atpB-1: rbcL-1	182	0.143
14	TabE- TabF	45	0,677

S: Sitios polimórficos, Hd: Diversidad Haplotípica

5.5 Modelo de sustitución y frecuencia nucleotídica

Para la evaluación se eliminaron todas las posiciones que contienen gaps (huecos) y datos faltantes. En total se evaluaron 24 modelos de sustitución nucleotídica a partir de los 23 individuos que representan las razas criollas colombianas. De acuerdo con los criterios de sustitución nucleotídica, el modelo con el puntaje más bajo de BIC (Criterio de Información Bayesiana) se considera el más adecuado para describir la consanguinidad existente entre los individuos y crear el árbol filogenético para la investigación. Para nuestro estudio el modelo

T92 (Tamura 3-parameter), obtuvo un BIC de 4338,8, siendo el valor más bajo entre los 24 modelos evaluados.

Su frecuencia nucleotídica nos estima el contenido de adenina (A), citosina (C) guanina (G) y tiamina (T). Para la región *atpB-1-rbcL-1*, se apreció un contenido alto de (A) y (T) con una frecuencia del 67,56 % respectivamente. Sin embargo, para (C) y (G) se observa una frecuencia del 32,44% siendo mucho menor que la relación (A-T). Para la evaluación se observó un total de 897 posiciones en el conjunto de datos finales (Tabla 10).

Tabla 10: Modelo de sustitución y frecuencia nucleotídica en la región *atpB-1-rbcL-1*.

Orden	Modelo	BIC	Freq A	Freq T	Freq C	Freq G
1	T92+G+I	4338,9	0,3378	0,3378	0,1622	0,1622
2	HKY+G+I	4356,8	0,3472	0,3284	0,1586	0,1658
3	HKY+I	4362,5	0,3472	0,3284	0,1586	0,1658
4	TN93+G+I	4364,1	0,3472	0,3284	0,1586	0,1658
5	JC+G+I	4428	0,25	0,25	0,25	0,25
6	K2+G+I	4437,2	0,25	0,25	0,25	0,25
7	GTR+I	4447,4	0,3472	0,3284	0,1586	0,1658
8	T92+G	4507,2	0,3378	0,3378	0,1622	0,1622
9	HKY+G	4525,4	0,3472	0,3284	0,1586	0,1658
10	TN93+G	4531,6	0,3472	0,3284	0,1586	0,1658
11	GTR+G	4549,2	0,3472	0,3284	0,1586	0,1658
12	GTR+G+I	4559,1	0,3472	0,3284	0,1586	0,1658
13	JC+G	4603,5	0,25	0,25	0,25	0,25
14	K2+G	4613	0,25	0,25	0,25	0,25
15	TN93+I	4870,9	0,3472	0,3284	0,1586	0,1658
16	T92	4908,5	0,3378	0,3378	0,1622	0,1622
17	T92+I	4918,4	0,3378	0,3378	0,1622	0,1622
18	HKY	4927,2	0,3472	0,3284	0,1586	0,1658
19	TN93	4930,6	0,3472	0,3284	0,1586	0,1658
20	GTR	4950,9	0,3472	0,3284	0,1586	0,1658
21	JC+I	4971,6	0,25	0,25	0,25	0,25
22	K2+I	4978	0,25	0,25	0,25	0,25
23	JC	5008	0,25	0,25	0,25	0,25
24	K2	5017,4	0,25	0,25	0,25	0,25

BIC: Bayesian Information Criterion.

Freq: Frecuencia. A: Adenina. T: Timina. C: Citocina. G: Guanina.

Abreviaciones: GTR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor.

5.6 Análisis descriptivo

De acuerdo a la evaluación de los marcadores, *atpB-1-rbcL-1* ofrece mayor favorabilidad al momento de realizar un estudio filogenético a nivel de especie para *Z. mays*, esto en base a la facilidad de amplificación y mayor número de sitios informativos respecto a los demás marcadores evaluados.

A partir de los resultados se construyó un árbol filogenético con el marcador *atpB-1-rbcL-1* para las introducciones de *Z. mays*, para observar su nivel de consanguinidad. De acuerdo al dendrograma basado en el método de Tamura 3-parameter, se observa un patrón claro de separación a nivel de grupo racial. El primer agrupamiento identifica un nivel de consanguinidad entre las razas Imbricado, Pollo y Pira como individuos primitivos de acuerdo a la clasificación de Roberts *et al.* (1957). Un segundo agrupamiento asocia a las razas Clavo, Güirúa, Cabuya, Yucatán, Costeño y Cariaco como materiales introducidos. Por último, se conformó un grupo entre las razas Maíz harinoso dentado, Puya grande, Chocoseño, Común, Sabanero, Montaña, Amagaceño, Pira naranja, Negrito, Puya, Maíz Dulce, Capiro y Cacao. El valor de Bootstrap para la conformación del árbol filogenético fue de 500 repeticiones (Figura 10).

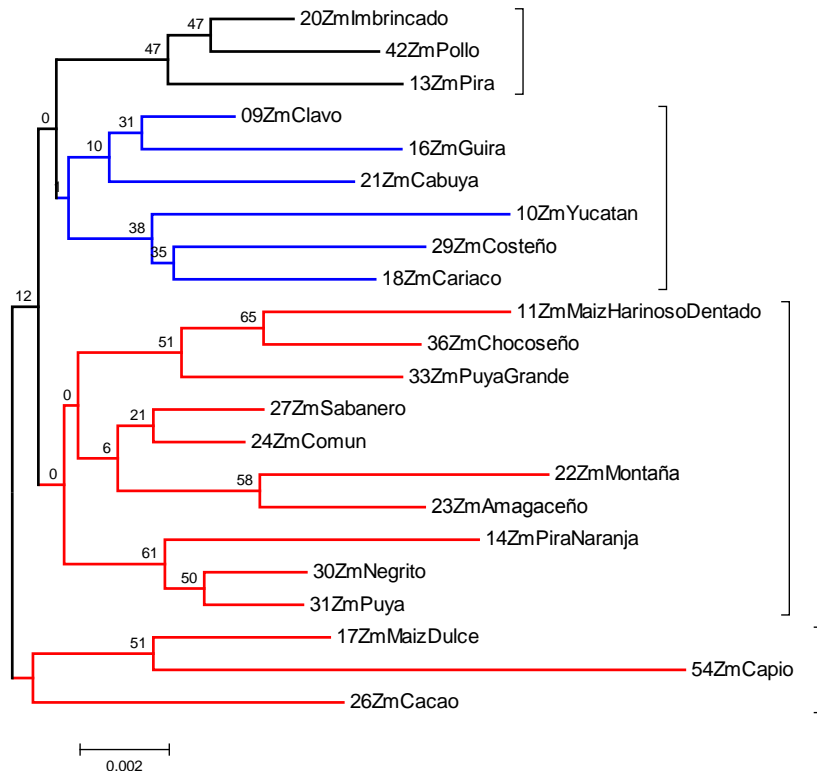


Figura 10. Estructura genética construida a partir del método Tamura 3 parameter, mediante el marcador cloroplástico *AtpB-1-RbcL-1*.

Un trabajo hecho por Cardona (2010) utilizando la estrategia Ward-MLM (Franco *et al.*, 2002) clasificó los grupos raciales de acuerdo a métodos estadísticos cuantitativos tomando como referencia el estudio de Roberts *et al.* (1957). Para el estudio se realizó un paralelo entre los tres métodos de clasificación en donde se observan similitudes y diferencias entre ellos. Roberts *et al.* (1957) clasifican las razas Pollo y Pira como materiales primitivos, mientras que Cardona (2010) amplía este grupo con tres razas más: Pollo, Pira, Pira Naranja, Clavo e Imbricado. Sin embargo, en nuestro estudio para este grupo racial se identifica a Pollo, Pira e Imbricado como razas primitivas.

En el segundo grupo racial, de acuerdo al primer estudio realizado a nivel de grupo racial, Roberts *et al.* (1957) indica siete razas: Güirúa, Andaquí, Pira Naranja, Cariaco, Clavo, Imbricado y Sabanero. Sin embargo, Cardona (2010) conforma este grupo con igual número de individuos (siete) pero solo dos de ellos (Güirúa y Andaquí) están en el mismo grupo al trabajo de Roberts *et al.* (1957). Los otros cinco están conformado por: Amagaceño, Común, Yucatán, Cacao y Puya Grande. En nuestro trabajo comparado con el trabajo de Roberts *et al.* (1957), se tienen en común las razas Güirúa, Clavo y Cariaco. El grupo lo completa las razas Yucatán, Costeño y Cabuya.

El tercer y último grupo racial de acuerdo Roberts *et al.* (1957) está conformado por 14 razas (Montaña, Cabuya, Capiro, Costeño, Negrito, Puya, Chococeño, Amagaceño, Común, Yucatán, Puya grande, Cacao, Harinoso dentado, Maíz dulce) y de acuerdo a nuestro trabajo se tiene una similitud de 11 razas respecto a la referencia (Tabla 10). A su vez, el estudio de Cardona (2010) solo presentó similitud con cinco razas (Montaña, Capiro, Negrito, Puya y Chococeño) (Tabla 11).

El estudio ha permitido diferenciar tres grupos, coincidiendo con los trabajos de Roberts *et al.* (1957) y Cardona (2010), clasificando las introducciones de maíz de Colombia en tres grupos raciales (Primitivas, Introducidas e Híbridas Colombianas). Sin embargo se encuentra diferencia en la ubicación de algunas introducciones de maíces a lo propuesto inicialmente por Roberts *et al.* (1957).

Tabla 11. Agrupamientos propuestos por Roberts *et al.* (1957) y Cardona (2010), mediante la estrategia WardMLM, frente a los obtenidos en el estudio.

Grupo Racial	Roberts <i>et al.</i> (1957)	Cardona (2010)	Estudio 2013
	Raza	Raza	Raza
Primitivas	Pollo	Pollo	Pollo
	Pira	Pira	Pira
		Pira Naranja	Imbricado
		Clavo Imbricado	

Introducidos	Guirúa Andaquí Pira Naranja Cariaco Clavo Imbricado Sabanero	Guirúa Andaquí Amagaceño Común Yucatan Cacao Puya Grande	Guirúa Cabuya Cariaco Yucatán Clavo Costeño
Híbridos	Montaña Cabuya Capio Costeño Negrito Puya Chococeño Amagaceño Común Yucatán Puya Grande Cacao Harinoso Dentado Maíz Dulce	Montaña Cabuya Capio Costeño Negrito Puya Chococeño Cariaco Sabanero	Montaña Pira Naranja Capio Sabanero Negrito Puya Chococeño Amagaceño Común Puya Grande Cacao Harinoso Dentado Maíz Dulce

6. CONCLUSIONES

El análisis entre grupos raciales muestra similitudes y diferencias de acuerdo a los estudios realizados por Roberts *et al.* (1957) mediante caracterización morfológica y Cardona (2010) utilizando la estrategia Ward-MLM (Franco *et al.*, 2002). Sin embargo se conservan los tres grupos raciales colombianos identificados inicialmente por Roberts *et al.* (1957), aunque con variaciones entre las razas que conforman los grupos.

De acuerdo a la evaluación realizada en el estudio a nivel de marcadores moleculares, *atpB-1-rbcL-1* de origen cloroplástico, presentó eficiencia en la identificación a nivel de grupos raciales para *Z. mays*, postulando como un potente marcador para futuros trabajos en diversidad genética para maíz.

El presente trabajo es una herramienta exploratoria y sirve como guía metodológica para llegar a estudios de diversidad genética en maíz utilizando secuencias de ADN.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AGROPANORAMA. 2013. Una forma diferente de ver el agro en América Latina. Tomado de: <http://www.agropanorama.com/news/Produccion-Mundial-de-Maiz.htm>
2. ANDERSON E.; CUTLER H.C. 1942. Races of *Zea mays* L.: I. Their recognition and classification. Ann. Missouri Bot. Gard. 29:69-89.
3. BENNETT, W. 1948. The Andean highlands: an introduction. In Stewart, Julian H. ed. Handbook of South American Indians, Bureau of American Ethnology 143. Vol. 2: 1 – 60.
4. BIANCHI A.; LORENZONI C.; SALAMINI F. 1989. Genetica dei cereali. Ed. Agricole, Italia. p. 376-379.
5. BRIEGER F.G.; GURGEL J.T.A.; PATERNIANI E.; BLUMENSCHNEIN A.; ALLEONI M.R. 1958. Races of maize in Brazil and other Eastern South American countries. NAS-NRC Publ. 593. Washington D.C., USA.
6. BROWN W.L. 1960. Races of maize in the West Indies. NAS-NRC Publ. 792. Washington D.C., USA.
7. BRUSÉS, B., L.L.; LUCERO, H.; AGUIRRE, M.V.; GORODNER, J.O. Comparación de técnicas de extracción de DNA para la detección de *Trypanosoma cruzi* mediante la Técnica de PCR (2000): p. 53-57. [Citado 12 de agosto del 2011]. <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2000/3_medicas/m_pdf/m_011.pdf>
8. BURGE, R.M. y DUENSING, W.J. 1989. Processing and dietary fiber ingredient applications of corn bran. Cereal Foods World 34: 535-538.
9. CAETANO, C. M. 2003. La aplicabilidad de la citogenética en *Zea mays* L. genes mutantes meióticos. En: Revista de Ciencias Agrícolas. Vol XX No. I – II p. 27 – 49.

10. CARDONA, J.O. 2010. Análisis de diversidad genética de las razas colombianas de maíz a partir de datos Roberts *et al.*, (1957) usando la estrategia Ward-MLM. *CienciAgro* Vol 2.1
11. CASTRESANA J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol.* .
12. CIMMYT. 2006. Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. Tercera edición. México, D.F.: CIMMYT.
13. CHENG, P.C. & PAREDDY, D.R. 1994. Morphology and development of the tassel and ear. In M. Freeling & V. Walbot, eds. *The maize handbook*, p. 37-47. New York, NY, USA, Springer-Verlag.
14. CSAIKL U., M.; BATIAN, H.; BRETTSCHEIDER, R.; GAUCH, S.; MEIR, A.; SCHAUERTE, M.; SCHOLZ, F.; UPERISEN, C.; VORNAM, B. y ZIEGENHAGEN, B. Comparative analysis of different DNA extraction Protocols: A fast, Universal maxi-preparation of High quality plant DNA for Genetic evaluation and phylogenetic studies. *Plant Molecular Biology Reporter*. 16: (1998): p. 69-86.
15. DELLAPORTA S.L., J., WOOD J. y HICKS J.B. 1983. A plant DNA minipreparation: Versión II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1(14): 19-21
16. DELLAPORTA, S.L. & CALDERÓN-URREA, A. 1994. The sex determination process in maize. *Science*, 94: 1501.
17. DÍAZ-A, C., M.E. BOTERO-E., ARBOLEDA-R, F. (1988). Banco de germoplasma de maíz de Colombia. *En: Taller Mundial sobre Bancos de Germoplasma de Maíz*. México, Marzo de 1988. 28 pp.
18. DOEBLEY, J. & H. H. ILTIS. 1980. Taxonomy of *Zea* (Gramineae). I. A subgeneric classification with key to taxa. *Amer. J. Bot.* 67(6): 982-993.
19. DOMANICO, N.; AIASSA, J.; IBÁÑEZ, M. et. Al; 2004. Caracterización y clasificación de híbridos simples de maíz con marcadores SSR. FAV, UNRC. Agencia n°3, 5800 Río Cuarto, Argentina.
20. DOYLE, J. J. y J. L. DOYLE. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: (1987): p. 11-15.

21. ESAU, K. 1977. Anatomy of seed plants, 2nd ed. New York, NY, USA, J. Wiley & Sons.
22. ESTEVA, G. 2003. Los árboles de las culturas mexicanas. En: Esteva, G. y C. Marielle (eds). Sin maíz no hay país. CONACULTA. Museo Nacional de las Culturas Populares. México. pp. 17-28.
23. FLÓREZ R, A. M. Contribución al estudio de la domesticación del zapallo *Cucurbita moschata* (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poir. Palmira, (2009): p.42. Trabajo de grado (Msc en Ciencias con énfasis en Recursos Fitogenéticos Neotropicales) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias.
24. FRANCO, J., J. CROSSA. (2002). The Modified Location Model for Classifying Genetics Resources: I. Association between Categorical and Continuous Variables. *Crop Sci.* 42: 1719-1726.
25. FULTON, T.M.; CHUNWONGSE, J.; TANKSLEY, S.D. 1995. Micropep Protocol for Extraction of DNA from Tomato and other Herbaceous. *Plant Mol Biol Rep* 13 (3), 207-209.
26. GALINAT, Walton C. 1979. Botany and origin of maize. In: Ciba – gigy Agrochemicals. Technical monograph. Switzerland. 105p. 6 – 17.
27. GALINAT, W.C. 1988. The origin of corn. In: G. F Sprague & J. W Dubbley, eds. *Corn and corn improvement*. 3rd, p. 1 – 31. Madison, W. I. USA, American Society of Agronomy.
28. GRANT U.J.; HATHEWAY W.H.; TIMOTHY D.H.; CASSALETT C.; ROBERTS L. 1963. Races of maize in Venezuela. NAS-NRC Publ. 1136. Washington D.C., USA.
29. GOODMAN M.M. and R.M. BIRD. 1977. Races of maize IV: tentative groupings of 219 Latin American races. *Econ. Bot.* 31:204-221.
30. HATHEWAY W.H. 1957. Races of maize in Cuba. NAS-NRC Publ. 453. Washinton D.C., USA. HAWKES J.G.
31. HENRY R., J. 1997. Useful routine protocols in plant molecular biology. En: *Practical Applications of Plant Molecular Biology*. Chapman & Hall, London, UK. [Citado 15 de mayo del 2010].

32. <<http://members.fortunecity.es/robertexto/archivo7/protocolos.htm>>
33. HIDALGO R., 2004. 2009. Universidad Nacional Palmira. Notas de clase sobre Valor de la Diversidad y Propiedad Intelectual.
34. ILTIS, H. H. & B.F. BENZ. 2000. *Zea nicaraguensis* (Poaceae), a new teosinte from Pacific Coastal Nicaragua, *Novon* 10: 382-390.
35. JEWIT, S.; PUDDEPHAT, I.; COVENEY, J.; DAVEY, M. R.; ALDERSON, P. G.; LOWE K. C. y POWER, J. B. Extraction of *Quercus* DNA from leaves is suitable for RAPD-PCR studies. *Tre biotechnology towards the millennium*. CAB Abstracts (1998): p.351-357.
36. KATO T.A., C. MAPES, L. M. MERA, J. A. SERRATOS, R. A. BYE. 2009. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Mexico. D.F. 116pp.
37. LARKIN M. A. *et al.* (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. In: *Bioinformatics*. Bd. 23, S. 2947-2948
38. LEIBOVICH, J.; GUTERMAN, L.; LLINAS, G.; BOTELLO, S. 2010. Estudio sobre la competitividad del maíz y la soya en la altillanura colombiana. Centro de estudios regionales cafeteros y empresariales. Bogotá D.C.
39. LINO, M.; 2002. Caracterización genotípica de plantas de maíz (*Zea mays* L.) utilizando secuencias microsatélites distribuidas uniformemente sobre el genoma. Universidad de Belgrado. Buenos Aires; Argentina.
40. MISTRİK, I. & MISTRİKOVÁ, I. 1995. Uptake, transport and metabolism of phosphates by individual roots of *Zea mays* L. *Biologia* (Bratislava), 50: 419-426.
41. MUÑOZ, J. E. 2011. Diversidad genética, estructura poblacional y selección de clones superiores de *Guadua angustifolia* Kunth en la eco-región cafetera de Colombia. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Agrarias. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. pp. 151.

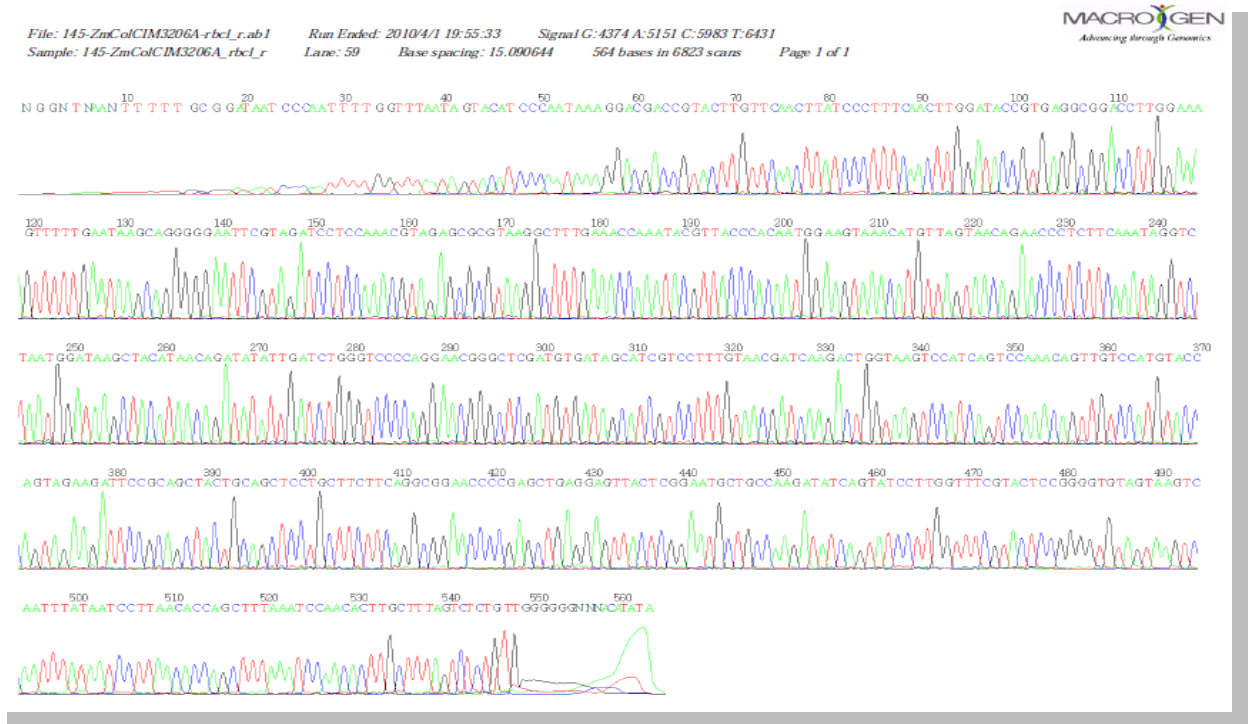
42. NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA 70: 3321-3323.
43. ONDERDONK, J.J. & KETCHESON, J.W. 1972. A standardization of terminology for the morphological description of corn seedlings. Can. J. Plant Sci., 52: 1003-1006.
44. PALIWAL, R. L.; GRANADOS, G.; LAFITTE H. R.; VIOLIC, A. D.; MARATHEE, J. P. 2001. El maíz en los trópicos. Mejoramiento y producción. Colección FAO: Producción y protección vegetal. No 28. On line:
45. PAINTING, K.A., PERRY, M.C., DENNING, R.A., AYAD, W. G. 1993. Guía para la documentación de recursos Genéticos. Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma. pp. 309.
46. PEÑARANDA, M.; Y NAVAS, A. 2005. Caracterización molecular y evaluación bioquímica de cultivares colombianos y germoplasma elite de maíz según contenido de aceite Programa Nacional de Recursos Genéticos y Biotecnología Vegetal, CORPOICA, C.I. Tibaitatá, Bogotá.
47. POT, 2010. Portal Oficial de la Alcaldía de Palmira. Posición Geográfica [online]. Palmira 2010 [Citado 20 de mayo de 2010]. <<http://www.palmira.gov.co/palmira/documentos/ubicacion.pdf>>
48. RAMÍREZ E.R.; TIMOTHY D.H.; DIAZ B.E.; GRANT U.J. 1960. Races of maize in Bolivia. NAS-NRC Publ. 747. Washington. D.C., USA.
49. ROZAS J, ROZAS R (1999). DnaSP, Version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. Bioinformatics. 15, 174 –175.
50. ROBERTS, L. M.; GRANT, U. J.; RAMÍREZ, R. E.; HATHEWAY, W. H.; SMITH, D. L.; MANGELSDORF, P. C. 1957. Razas de maíz en Colombia. DIA Boletín Técnico No 2. Ministerio de Agricultura. Editorial Máxima. Bogotá.
51. SÁNCHEZ G., J., M.M. GOODMAN, AND C.W. STUBER. 2000. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. Econ. Bot. 54(1):43-59.

52. SÁNCHEZ G.J.J., KATO Y.T.A., AGUILAR M.S.M., HERNANDEZ C.J.M., LOPEZ C.A.R. Y J.A.C. RUIZ. 1998. Distribución y caracterización del teocintle. Libro Técnico No. 2 del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).
53. SEVILLA, P. R., y HOLLE, O. M. 2004. Recursos genéticos vegetales.
54. SCHAAL B, OLSEN K. 2000. Gene genealogies and population variation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7024–7029
55. SLATKIN, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16:393 - 430.
56. TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, AND KUMAR S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731 -2739.
57. VALADEZ, M. E. 2000 Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio), Mundi-Prensa, México, D.F. (2000): p.147
58. VALLEJO, F. A., ESTRADA, E. I. 2002. Mejoramiento genético de plantas. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. pp. 402.
59. VARGAS, L.A. 2007 La historia incompleta del maíz y su nixtamalización. *Cuadernos de Nutrición* 30 (3):97-102.
60. VASAL, S. K.; MCLEAN, S.; NARRO, L. 1994. Lowland tropical germplasm development and population improvement at CIMMYT headquarters. In S. K. Vasal & S. McLean, eds. The lowland tropical maize subprogram. CIMMYT Maize Program Special Report, p. 1-13. México, D. F.
61. VIGOUROUX, Y., J.C. GLAUBITZ, Y. MATSUOKA, M.M. GOODMAN, J. SÁNCHEZ G., AND J.DOEBLEY. 2008. Population structure and genetic diversity of new world maize races assessed by DNA microsatellites. *Amer. J. Bot.* 95(10):1240-1253.
62. WANG, H.; MEIGING, Q. y A. CUTLER, J. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids. Res.* 21 (2005): p.4153 - 4154.

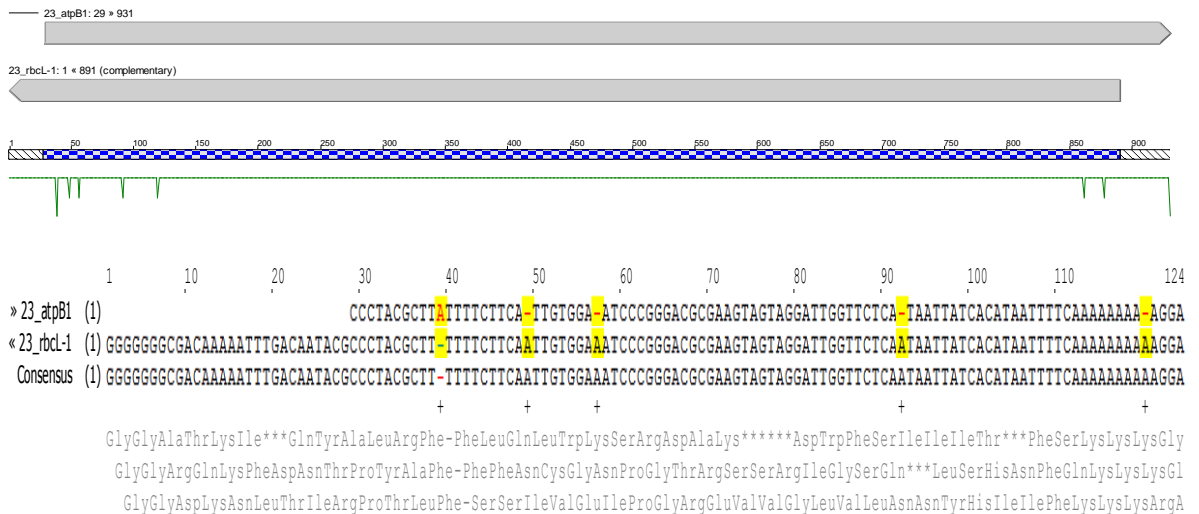
63. WEIR B., J.; R. PIERRE, P. y R. CHIBBAR. N. Isolation of DNA for RAPD. Analysis from leaves of the saskatoon (*Amelanchier alnifolia* Nutt) and other horticultural crops. *Canadian journal of plant science*(1996): p.819– 824.
64. WELLHAUSEN, E. J.; ROBERTS, L. M.; HERNÁNDEZ, X. E.; MANGELSDORF, P. C. 1951. Razas de maíz en México: su origen, características y distribución. Folleto técnico No 5, Oficina de Estudios Especiales, Secretaría de Agricultura y Ganadería, México.
65. WELLHAUSEN E.J.; ROBERTS L.M.; HERNANDEZ E. 1952. Races of maize in Mexico, their origen, characteristics, and distribution. The Bussey Inst. Harvard Univ. Cambridge, Massachusetts, USA. 223 pp.
66. WELLHAUSEN E.J.; FUENTES A.; HERNANDEZ A.; MANGELSDORF P.C. 1957. Races of maize in Central America. NAS-NRC Publ. 511. Washington D.C., USA.
67. WEATHERWAX, P. 1954. Indian corn in old America. New York, NY, USA, MacMillian Publishing.
68. ZIEGLER, KENNETH E. 2001. Popcorn. In: Library of Congress cataloging-in- publication Data. 2nd Ed. 139 – 234.

8. ANEXOS

Anexo 1. Calidad de los electroferogramas utilizados en el estudio para el marcador AtpB-1-RbcL-1.



Anexo 2. Ensamble de las hebras complementaria para el marcador AtpB-1-Rbc-1 mediante el software Vector advance 10.3.



Anexo 5. Protocolo de extracción de (Doyle y Doyle, 1987 a base de CTAB 1%, modificado por el CIMMYT, 2006).

- 1 Calentar la solución de amortiguadora CTAB a 65°C.
2. Colocar 50 mg de tejido liofilizado y molido en un tubo de 2 ml (como se utilizó un tubo de 1.5 ml, se redujeron todos los volúmenes en un 25%).
3. Agregar 750 ul de la solución amortiguadora CTAB. Mezclar por inversión, para homogenizar el tejido con la solución amortiguadora.
- 4 Incubar y mover los tubos con suavidad en un agitador de balance en un horno a 65°C durante 90 minutos.
- 5 Retirar los tubos del horno y enfriar durante 5-10 minutos a temperatura ambiente.
- 6 Agregar 375 ul de fenol cloroformo alcohol isoamílico (FCI, 24:24:1). Agitar los tubos por inmersión durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 7 Centrifugar a 13.200 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos para formar una fase acuosa (líquido de color amarillo) y una fase orgánica (color verde oscuro).
- 8 Recuperar aproximadamente 563 ul de la fase acuosa y vacíela en un tubo nuevo de 1.5 ml.
- 9 Agregar 375 ul de cloroformo alcohol isoamílico (C:I, 24:1). Agitar los tubos por inversión durante 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 13.200 rpm durante 5 minutos.
- 10 Recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo.
- 11 Agregar 1 volumen de isopropanol al 100% previamente enfriado en un refrigerador a -20°C. Mezclar por inversión para favorecer la precipitación del DNA e incubar por 1 hora a -20°C. *Paso opcional: incubar las muestras a -20°C durante toda la noche, sobre todo si no es visible el DNA precipitado.*
- 12 Centrifugar a 13.200 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos para precipitar y formar la pastilla de DNA en el fondo del tubo. Desechar el isopropanol por decantación.
- 13 Agregar 750 ul de etanol al 75%. Lavar suavemente la pastilla de DNA. Desechar el alcohol por decantación. Dejar que el alcohol se seque a temperatura ambiente hasta que la pastilla se seque. Si todavía se siente olor a alcohol, esto indica que la pastilla no está completamente seca.

14 Resuspender la pastilla en 50 ul de TE1X

15 Adicionar 0.5 ul de RNAsa a cada muestra e incubar a 37°C durante 30 minutos, agitándolos periódicamente.

16 Almacenar a -20°C para sus posteriores usos.