



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

ANÁLISIS MOLECULAR DE 79 ACCESIONES DE MAÍZ (*ZEA MAYS* L.)
RECOLECTADAS EN LA PROVINCIA DE EL ORO

RODAS SOLANO CESAR NICOLAY
INGENIERO AGRÓNOMO

MACHALA
2021



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Análisis molecular de 79 accesiones de maíz (*Zea mays* L.)
recolectadas en la Provincia de El Oro

RODAS SOLANO CESAR NICOLAY
INGENIERO AGRÓNOMO

MACHALA
2021



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TRABAJO TITULACIÓN
TRABAJO EXPERIMENTAL

Análisis molecular de 79 accesiones de maíz (*Zea mays* L.) recolectadas en la Provincia
de El Oro

RODAS SOLANO CESAR NICOLAY
INGENIERO AGRÓNOMO

QUEVEDO GUERRERO JOSE NICASIO

MACHALA, 28 DE ABRIL DE 2021

MACHALA
2021

Tesis Rodas

INFORME DE ORIGINALIDAD

7%

INDICE DE SIMILITUD

7%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León Trabajo del estudiante	2%
2	es.scribd.com Fuente de Internet	1%
3	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS Trabajo del estudiante	1%
4	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	1%
5	repositorio.unheval.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	www.rte.espol.edu.ec Fuente de Internet	1%

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Apagado

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

El que suscribe, RODAS SOLANO CESAR NICOLAY, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito titulado Análisis molecular de 79 accesiones de maíz (*Zea mays* L.) recolectadas en la Provincia de El Oro, otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

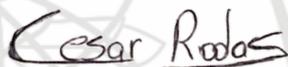
El autor declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

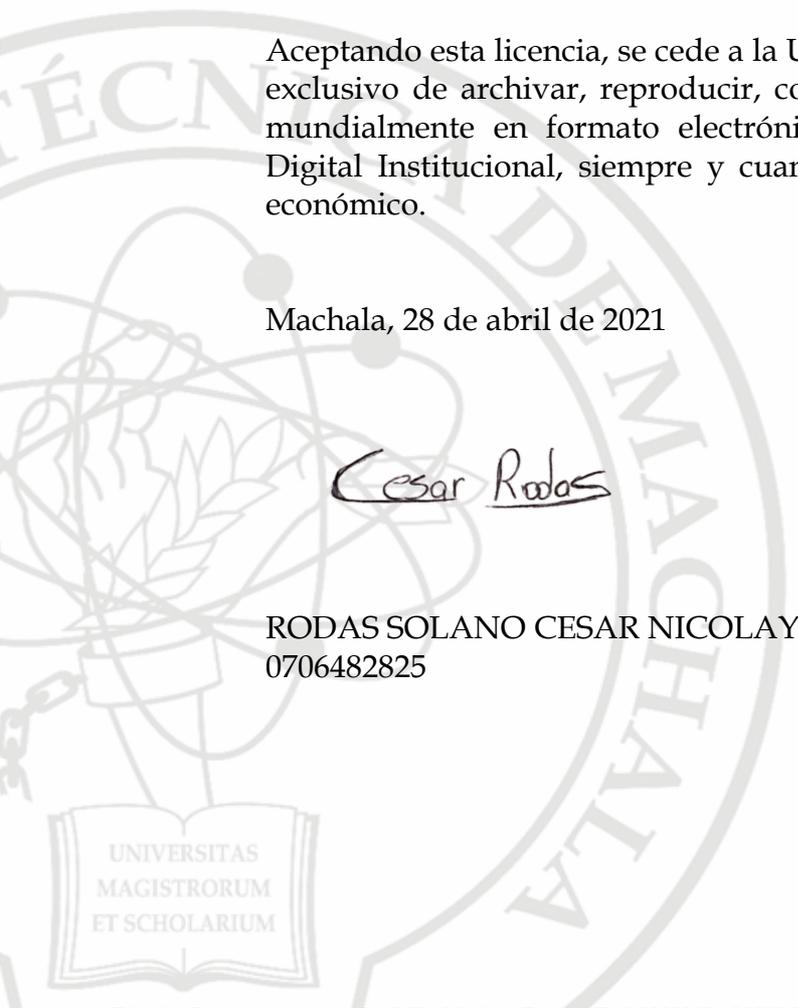
El autor como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 28 de abril de 2021



RODAS SOLANO CESAR NICOLAY
0706482825



UNIVERSITAS
MAGISTRORUM
ET SCHOLARIUM

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a Dios por brindarme salud y fortaleza día a día, a mi padre Pedro Rodas por formar en mí una persona seria y responsable con respecto a mis decisiones, principalmente por ser un gran guía en mi vida, agradezco todas sus enseñanzas, a mi madre Blanca Solano, que gracias a su comprensión y valores que me ha inculcado, han hecho de mí una persona de buenos principios. Ambos fueron mi apoyo incondicional a lo largo de toda mi carrera universitaria, por eso este trabajo en gran parte es dedicado para ellos. A mis hermanos que son un gran ejemplo de resiliencia total, motivo crucial para no abandonar mis objetivos y convertirme igualmente en un ejemplo de motivación para ellos.

AGRADECIMIENTO

Un total agradecimiento a Dios por permitirme cumplir uno de mis grandes objetivos, al brindarme fuerza y voluntad para solventar los problemas que se han presentado a lo largo de la carrera universitaria.

A mis padres que sin lugar a duda son mis más grandes pilares en la vida, acompañándome en todo momento en mi camino de estudio.

A mi tutor de tesis, Ing. José Quevedo, por ser uno de los mejores docentes de la Universidad Técnica de Machala y gran ejemplo a seguir, principalmente por ser un gran influyente en mi perspectiva hacia la carrera de ingeniería agronómica en cada una de sus clases impartidas.

Al Ing. Julio Chabla por ser uno de los docentes más comprometidos con su profesión, y demostrar su calidad de enseñanza en cada una de sus clases impartidas.

**ANÁLISIS MOLECULAR DE 79 ACCESIONES DE MAÍZ (*Zea mays* L.)
RECOLECTADAS EN LA PROVINCIA DE EL ORO**

Rodas Solano, César Nicolay

Quevedo Guerrero, José

RESUMEN

El maíz (*Zea mays* L.), es uno de los cultivos que debido a su gran diversidad genética, es aprovechado para programas de mejoramiento vegetal, producción de alimentos y conservación de identidad. El objetivo principal de este trabajo es la determinación genotípica entre 79 accesiones de maíz, mediante la utilización de marcadores moleculares ISSR. El presente proyecto fue realizado en la provincia de El Oro, principalmente en el cantón de Machala, las accesiones a utilizarse fueron obtenidas del banco de germoplasma del Semillero de Investigación en Recursos Fitogenéticos (SIRF), para el muestreo de hojas se seleccionaron las primeras hojas desarrolladas desde la parte superior de la planta y que estén completamente sanas, posteriormente fueron enviadas al laboratorio de identificación molecular (IDgen), la metodología empleada fue la de extracción de ADN y amplificación por PCR convencional. Los patrones de bandas obtenidos mediante los cebadores ISSR, analizaron las relaciones existentes entre las 79 accesiones, y el tamaño de los fragmentos oscilaban entre 100 a 10 000 bp. Sin embargo, tres de los cebadores no mostraron información sobre polimorfismo, de modo que los restantes visualizaron la presencia de siete genotipos de maíz, de este modo se calculó una matriz de similitud por pares, mediante la utilización del coeficiente de Dice, el mismo que fue empleado para la realización de un análisis de conglomerados, por el método de grupos de pares no ponderados con promedios aritméticos, mostrando una alta diferencia entre las accesiones debido a la baja correlación cofenética ($r = 0.3$). Se observa que con un coeficiente de correlación cofenética de 0.32, las accesiones evaluadas

forman seis grupos principales. El primer grupo lo integraron las que mostraron alta divergencia, entre ellas SIRF 62, SIRF 52 y SIRF 37. Sin embargo, el segundo grupo fue el que presentó la accesión más divergente entre todas, integrada únicamente por SIRF 20. El tercer grupo está formado por dos subgrupos, el primero lo compone SIRF 22, SIRF 23 y SIRF 21, el segundo subgrupo está establecido por dos únicas accesiones SIRF 38 y SIRF 07. El cuarto grupo lo constituyen dos subgrupos, en el primero se ubica desde SIRF 66 hasta SIRF 64, el segundo subgrupo lo conforman varias asociaciones y está compuesto desde SIRF 79 hasta SIRF 17. El quinto grupo se estableció desde la accesión SIRF 60 hasta SIRF 53. El sexto y último grupo está conformado por la mayoría de las accesiones, formando dos grandes subgrupos, el primero lo integran varias asociaciones y está establecido desde SIRF 46 hasta SIRF 16, el segundo gran subgrupo está constituido desde SIRF 30 hasta SIRF 01. Las accesiones que mostraron una mayor similitud fueron SIRF 18 y SIRF 19 con un coeficiente de correlación de 0.85, SIRF 48 y SIRF 50 presentaron un coeficiente de 0.83. No obstante, las más interesantes para aprovechar en un programa de conservación y mejoramiento vegetal, son las que presentaron mayor divergencia en relación a las demás, como fue en el caso de SIRF 20 con un coeficiente de correlación de 0.34, y SIRF 37 con un coeficiente de 0.36 asociándose con SIRF 52 y SIRF 62. Así mismo se realizó un Análisis de coordenadas principales en el plano de dos dimensiones, con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos en el dendrograma, visualizándose una separación en todas las accesiones, siendo el cuadrante positivo de la coordenada 1 y negativo de la coordenada 2, donde se ubicó la mayor parte de ellas, seguido del cuadrante negativo de la coordenada 1 y negativo de la coordenada 2. Es preciso destacar que las accesiones que presentaron mayor divergencia en el dendrograma SIRF 37, SIRF 52, SIRF 62 y SIRF 20, en cuanto al análisis de coordenadas principales se observaron distantes entre sí, a excepción de SIRF 37 y 62 que se ubicaron en el

cuadrante positivo de la coordenada 1 y negativo de la coordenada 2, SIRF 20 se ubicó cerca. Sin embargo, SIRF 52 fue la que más disimilitud presentó con relación a las demás, al igual que SIRF 68, SIRF 55 y SIRF 28, todas en cuadrantes diferentes. No obstante, SIRF 17, SIRF 25, SIRF 30, SIRF 07 y SIRF 26 fueron las que tuvieron un mayor grado de similitud a excepción de las otras. SIRF 18 y SIRF 19 que mostraron más similitud en el dendrograma se ubicaron en el mismo cuadrante, cerca de la coordenada 1 y negativo de la coordenada 2. El plano 3D (Figura 7), nos permite visualizar de mejor forma la variabilidad genética que existe entre las accesiones de estudio, del mismo modo se ratifica el plano bidimensional con respecto a SIRF 52, SIRF 55, SIRF 68 y SIRF 28 que se mantenían distantes en sus cuadrantes, de igual modo se comprueba que SIRF 17, SIRF 25, SIRF 30, SIRF 07 y SIRF 26 se encuentran con un mayor mejoramiento con respecto a las demás. Se concluye que los resultados de variabilidad que existen dentro del banco de germoplasma del SIRF, sugieren la conservación de aquellas accesiones, sobre todo las que presentaron mayor disimilitud, a fin de realizar programas de mejoramiento genético en el cultivo de maíz.

Palabras claves: Diversidad genética, accesión, maíz, fitomejoramiento, inter-microsatélites, polimorfismo, agrupamiento.

**MOLECULAR ANALYSIS OF 79 CORN ACCESSIONS (*Zea mays* L.) COLLECTED IN
THE PROVINCE OF EL ORO**

Rodas Solano, César Nicolay

Quevedo Guerrero, José

ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) is one of the crops that, due to its great genetic diversity, is used for plant breeding programs, food production and identity conservation. The main objective of this work is the genotyping of 79 maize accessions using ISSR molecular markers. The present project was carried out in the province of El Oro, mainly in the canton of Machala, the accessions to be used were obtained from the germplasm bank of the Semillero de Investigación en Recursos Fitogenéticos (SIRF), for leaf sampling the first leaves developed from the top of the plant and that are completely healthy were selected, then they were sent to the molecular identification laboratory (IDgen), the methodology used was DNA extraction and amplification by conventional PCR. The banding patterns obtained with the ISSR primers analyzed the relationships between the 79 accessions, and the fragment sizes ranged from 100 to 10 000 bp. However, three of the primers did not show information on polymorphism, so the remaining ones visualized the presence of seven maize genotypes, thus a pairwise similarity matrix was calculated, using the Dice coefficient, which was used to perform a cluster analysis, by the method of groups of unweighted pairs with arithmetic averages, showing a high difference between the accessions due to the low cophenetic correlation ($r = 0.3$). It is observed that with a coefficient of cophenetic correlation of 0.32, the evaluated accessions form six main groups. The first group was composed of those that showed high divergence, among them SIRF 62, SIRF 52 and SIRF 37. However, the second group was the one that presented the most divergent accession among all, composed only by SIRF 20. The third

group is formed by two subgroups, the first one is composed by SIRF 22, SIRF 23 and SIRF 21, the second subgroup is established by only two accessions SIRF 38 and SIRF 07. The fourth group is formed by two subgroups, the first one is located from SIRF 66 to SIRF 64, the second subgroup is formed by several associations and is composed from SIRF 79 to SIRF 17. The fifth group was established from accession SIRF 60 to SIRF 53. The sixth and last group is made up of the majority of the accessions, forming two large subgroups, the first is made up of several associations and is established from SIRF 46 to SIRF 16, the second large subgroup is constituted from SIRF 30 to SIRF 01. The accessions that showed the greatest similarity were SIRF 18 and SIRF 19 with a correlation coefficient of 0.85, SIRF 48 and SIRF 50 presented a coefficient of 0.83. However, the most interesting ones to take advantage of in a conservation and plant improvement program are those that presented greater divergence in relation to the others, as was the case of SIRF 20 with a correlation coefficient of 0.34, and SIRF 37 with a coefficient of 0.36 associated with SIRF 52 and SIRF 62. Likewise, an analysis of principal coordinates in the plane of two dimensions was carried out, with the purpose of corroborating the results obtained in the dendrogram, visualizing a separation in all the accessions, being the positive quadrant of coordinate 1 and negative of coordinate 2, where most of them were located, followed by the negative quadrant of coordinate 1 and negative of coordinate 2. It should be noted that the accessions that presented greater divergence in the dendrogram SIRF 37, SIRF 52, SIRF 62 and SIRF 20, in terms of the analysis of principal coordinates were observed distant from each other, with the exception of SIRF 37 and 62 that were located in the positive quadrant of coordinate 1 and negative of coordinate 2, SIRF 20 was located nearby. However, SIRF 52 was the most dissimilar to the others, as were SIRF 68, SIRF 55 and SIRF 28, all in different quadrants. However, SIRF 17, SIRF 25, SIRF 30, SIRF 07 and SIRF 26 had the highest degree of similarity with the exception of the others. SIRF 18 and

SIRF 19 that showed more similarity in the dendrogram were located in the same quadrant, close to coordinate 1 and negative to coordinate 2. The 3D plane (Figure 7), allows us to visualize in a better way the genetic variability that exists between the accessions of study, in the same way the two-dimensional plane is ratified with respect to SIRF 52, SIRF 55, SIRF 68 and SIRF 28 that were distant in their quadrants, in the same way it is verified that SIRF 17, SIRF 25, SIRF 30, SIRF 07 and SIRF 26 are with a greater improvement with respect to the others. It is concluded that the results of variability that exist within the germplasm bank of SIRF suggest the conservation of those accessions, especially those that presented greater dissimilarity, in order to carry out genetic improvement programs in the maize crop.

Key words: genetic diversity, accession, maize, plant breeding, inter-microsatellite, polymorphism, clustering.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Objetivo general	14
1.2. Objetivos específicos.....	14
2. REVISIÓN DE LITERATURA	15
2.1. Origen y domesticación del maíz.....	15
2.2. Importancia del maíz en el mundo y en el ecuador	16
2.3. Diversidad genética	16
2.4. Razas de maíz en el ecuador	17
2.5. Conservación de maíz	18
2.6. fitomejoramiento en maíz.....	18
2.7. Diversidad en maíz a través de marcadores moleculares	20
2.7.1. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).....	20
2.7.2. Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD).....	21
2.7.3. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP).....	21
2.7.4. Microsatélites o Secuencias simples repetidas (SSR)	21
2.7.5. Inter-Secuencias simples repetidas (ISSR).....	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Ubicación o localización del trabajo	23
3.2. Materiales	23
3.2.1. Material de campo	23
3.3. Método de evaluación	24
3.3.1. Evaluación en campo.....	24

3.3.1.1. Toma de muestras	25
3.4. Análisis en laboratorio	25
3.4.1. Extracción de ADN	25
3.4.2. Cebadores ISSR.....	25
3.4.3. Amplificación del ADN y electroforesis	26
3.5. Análisis de datos.....	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1. Amplificación PCR y polimorfismo	28
4.2. Análisis de conglomerados o clúster	29
4.3. Análisis de coordenadas principales	32
5. CONCLUSIONES.....	35
6. RECOMENDACIÓN	36
7. BIBLIOGRAFÍA.....	37
8. ANEXOS.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores ISSR, secuencia genética y temperatura empleada en la caracterización molecular. G: guanina; A: adenina; C: citosina; Y: citosina o timina.	25
Tabla 2. Número de polimorfismo y genotipos de maíz mediante PCR convencional	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología del teosinte y del maíz.....	15
Figura 2. Distribución de las principales razas de maíz generadas por el INIAP-EESC	17
Figura 3. Muestras de maíz en el banco de germoplasma del CIMMYT	18
Figura 4. Variedades criollas de maíz mexicano del banco de germoplasma del CIMMYT	19
Figura 5. Mapa político de El Oro	23
Figura 6. Acciones de maíz del banco de germoplasma del SIRF.	24
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 2 % teñido con Bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular 100 bp generuler Invitrogen., muestras de maíz 1-37. ISSR (GA) 9C.....	28
Figura 8. Dendrograma representativo de la diversidad genotípica entre 79 acciones de maíz, construidos a partir de una matriz de similitud por pares utilizando el coeficiente de Dice (1945).	31
Figura 9. Distribución de las 79 acciones de maíz del banco de germoplasma del SIRF, mediante un análisis de coordenadas principales (PcoA) en representación 2D de su similitud.	33
Figura 10. Análisis de coordenadas principales (PcoA) en representación 3D de la similitud de las 79 acciones de maíz.	34

ANEXOS

Anexo 1. Limpieza del terreno.	47
Anexo 2. Preparación del terreno.	47
Anexo 3. Elección de las accesiones para la siembra.	48
Anexo 4. Acceso SIF 15	48
Anexo 5. Emergencia de las plántulas.	48
Anexo 6. Desarrollo de las accesiones de maíz.	49
Anexo 7. Accesiones de maíz en óptimo estado para la toma de muestras.	49

1. INTRODUCCIÓN

El maíz es uno de los cereales de mayor importancia a nivel mundial (Yang et al., 2017), perteneciente a la familia de las gramíneas (Deza & Delgado de la flor, 2018), es cultivado en más de 70 países (Pérez et al., 2019), donde alberga una exuberante diversidad genética (Vega et al., 2017), que hace referencia a las variaciones heredables que sucede en cada espécimen, entre individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie (López et al., 2018).

Este estudio permite la identificación de alelos favorables que propicien el mejoramiento genético de las plantas (Barrera et al., 2020), producción de alimentos, conservación de la identidad, evolución del conocimiento local y el mantenimiento de las fuentes de trabajo (Castillo, 2016). La conservación de especie es uno de los métodos que más destaca debido a la condición alógama que presenta el maíz (Delgado, 2018), pues permite la continuidad en procesos de aclimatación genética en poblaciones locales (Dzib Aguilar et al., 2016), la misma que estará en dependencia de las condiciones ecológicas, propiedades fisicoquímicas y la biología de la semilla (Valdes et al., 2016).

Los marcadores moleculares son herramientas que nos permiten realizar caracterizaciones de la variabilidad y la estructura genética de las poblaciones (Ramalho et al., 2016), así como el vínculo y asociación genética que existe dentro del germoplasma del cultivo (Cervantes et al., 2016), por lo que son de gran utilidad para la conservación del maíz, en donde va a existir una amplia disposición de diversidad genotípica de las acciones (Merchán et al., 2017), que permitan obtener ejemplares que presenten una buena respuesta, adaptación y resistencia a los cambios extremos en el entorno donde se encuentren (Arias et al., 2018).

Los microsatélites del tipo Inter secuencias simples repetidas (ISSR), es una de las técnicas más infalibles para la caracterización de diversidades genéticas (Zhang et al., 2019), puede diferenciar

rápidamente individuos relacionados estrechamente (Reyes, 2016), principalmente infieren en las relaciones genéticas vinculadas a su origen (Ruiz et al., 2018), morfología (Giustina et al., 2017), aspectos ecogeográficos (Morales, 2017), distribución y usos (Morales, 2016).

1.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la diversidad genotípica entre las 79 accesiones de maíz, mediante la utilización de marcadores moleculares ISSR, que permita la conservación de la diversidad.

1.2. Objetivos específicos

- Determinar las accesiones que presenten similitud y disimilitud.
- Corroborar las accesiones que presentaron mayor relación.
- Seleccionar las mejores accesiones para futuros programas de conservación y mejoramiento vegetal.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ORIGEN Y DOMESTICACIÓN DEL MAÍZ

El maíz (*Zea mays* L.) tiene una gran incertidumbre con respecto al lugar donde proviene, comúnmente se cree que es originario del territorio mexicano, por las múltiples pruebas ancestrales de hace 9 000 años que se han descubierto con el pasar del tiempo, su origen se encuentra en el Valle Central del río Balsas en el sur de México, debido a la alta relación génica que posee con una hierba llamada teosinte del género *Zea* (Figura 1.) y otros géneros como el *Tripsacum* y *Euchlaena* (Deras, 2020; Villanueva & Quero, 2015). No obstante, su domesticación llevó un largo tiempo, debido a la dura cubierta de aquel ancestro, la cual hacía imposible el desgrane del mismo. Sin embargo, con el pasar del tiempo y la selección minuciosa de ciertas plantas que no presentaban dificultad para su cosecha, fueron dando paso a las variedades mejoradas que se conoce hoy en día (Herrera et al., 2020; Simón & Golik, 2018).

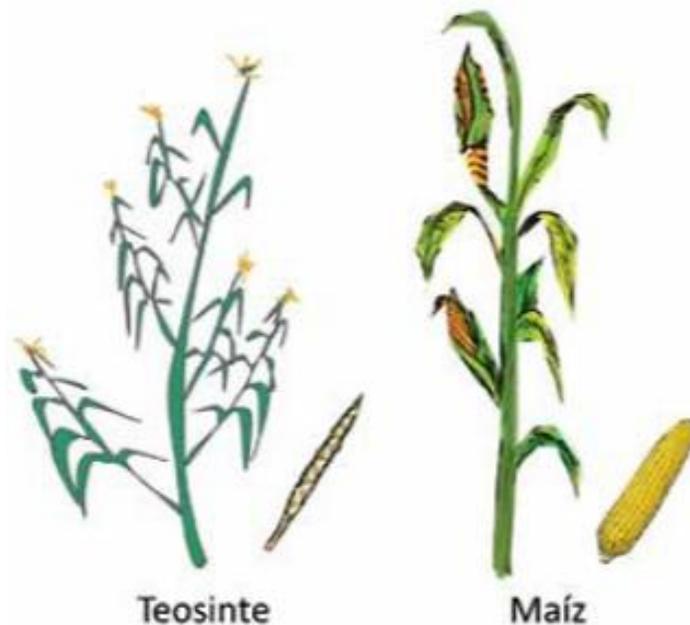


Figura 1. Morfología del teosinte y del maíz

Fuente. Herrera et al. (2020).

2.2. Importancia del maíz en el mundo y en el Ecuador

El maíz forma parte de los 3 cereales más importantes a nivel mundial junto al trigo y el arroz, su cultivo es de suma importancia económica debido a los multipropósitos que posee, ya sea como alimento humano, animal o fuente de productos industriales (Hryczyński et al., 2020; Santana et al., 2018). En el Ecuador el maíz es uno de los granos de mayor importancia para los pueblos indígenas, ya que compone la base de una de las principales cadenas de producción, principalmente como componente de los alimentos balanceados para aves, ganado, camarón y porcinos (Baca, 2016), seguido por su gran adaptabilidad en sus variedades a las diferentes condiciones ambientales, pues son cultivadas en la región costa, sierra y oriente (Alemán et al., 2020). En el año 2019 el cultivo de maíz, principalmente el duro presentó un crecimiento notable de producción de un 11.6% en comparación a años anteriores (Márquez, 2020).

2.3. Diversidad genética

La diversidad genética es uno de los componentes fundamentales de la biodiversidad, y es relacionada a la variabilidad heredable que sucede en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie (Rimieri, 2017). En plantas hay una alta asociación entre la diversidad genética y su distribución geográfica, ya que mientras una especie sea de gran distribución se mantendrán los niveles de variabilidad a excepción de una especie endémica (Pingarroni et al., 2020).

El Ecuador es un país que mantiene una alta diversidad genética en lo que refiere al cultivo de maíz, la conservación de este cereal representará a futuro uno de los recursos naturales más importantes para la supervivencia, sostenibilidad rural y principalmente la seguridad alimentaria para las futuras generaciones (Coral, 2017).

2.4. Razas de maíz en el Ecuador

Según Anderson & Cutler (1942), la palabra raza hace referencia a un grupo de individuos emparentados, los cuales mantienen suficientes características en común para su posible identificación. En el Ecuador existe un gran número de razas de maíz llegando a formar 29, de las cuales 17 son de la sierra ecuatoriana (Figura 2.), principalmente las razas Cuzco, guagal, mishca, entre otros (Farinango, 2015). La provincia de Imbabura el espacio donde se cultivan variedades locales con distintas propiedades agronómicas y culinarias (Morales, 2016; Valverde, 2015).

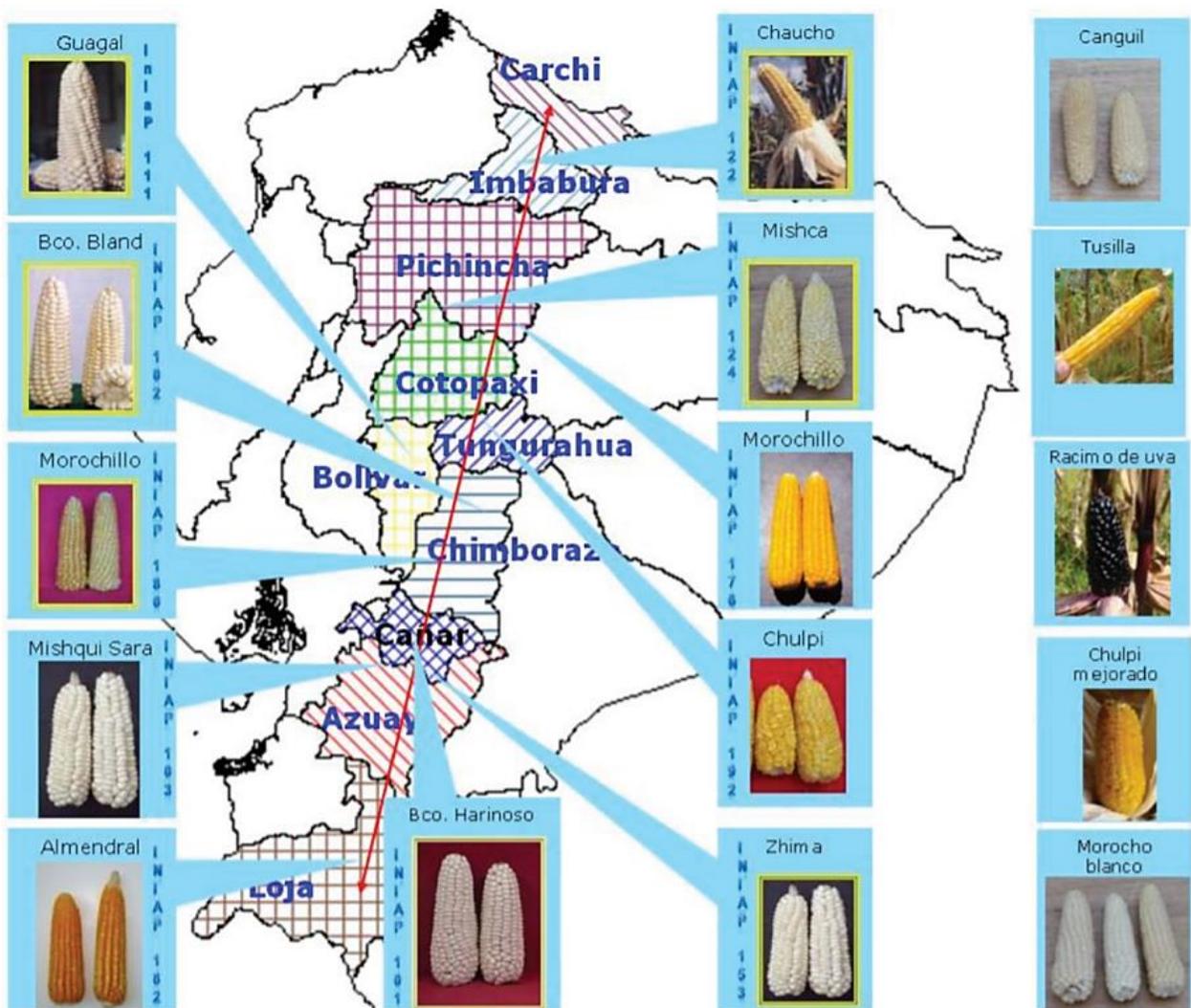


Figura 2. Distribución de las principales razas de maíz generadas por el INIAP-EESC

Fuente. Yáñez et al. (2013).

2.5. Conservación de maíz

Existen dos métodos de conservación de diversidad genética, como in situ que trata sobre la conservación de poblaciones y ecosistemas en sus hábitats de origen y la ex situ que se centra en la utilización de bancos de germoplasma cuya función principal es la de conservar especies que se encuentren en peligro de extinción por algún factor adverso, o simplemente por cuidar aquellas características deseables que presente aquella accesión o raza de un cultivo, y que este recurso persista para la utilización de las actuales o futuras generaciones para un futuro programa de mejoramiento vegetal (Costich & Zavala, 2017; Uribe, 2015).



Figura 3. Muestras de maíz en el banco de germoplasma del CIMMYT

Fuente. CIMMYT (2017)

2.6. fitomejoramiento en maíz

Actualmente existe un gran apoyo al fitomejoramiento en el cultivo de maíz, muchos centros de investigación como el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal, mejor conocido como CENTA, invierten sus recursos principalmente para la obtención de variedades mejoradas, principalmente en la producción de semilla certificada con un mayor rendimiento, alto valor nutricional, buena capacidad de adaptación a condiciones adversas del clima, además de facilitar a los agricultores la manipulación de las plantas a la hora de un correcto manejo agronómico,

principalmente a la cosecha (Ayala, 2019). Así mismo el Centro Internacional para el Mejoramiento del Maíz y el Trigo, mejor conocido por sus siglas como CIMMYT, es conocido por poseer una de las más grandes colecciones de maíz en su banco de germoplasma, tales como líneas endocriadas, híbridos, cultivares sintéticos, variedades de libre polinización y razas mejoradas (Pérez & García, 2020).

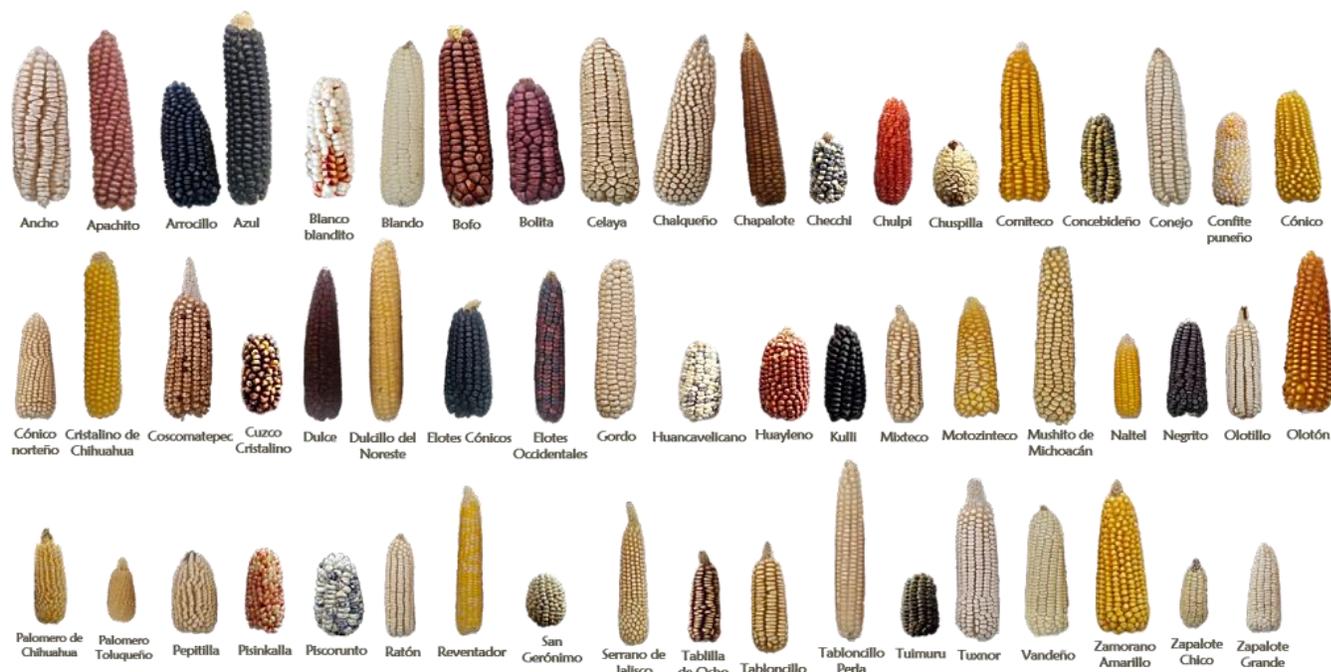


Figura 4. Variedades criollas de maíz mexicano del banco de germoplasma del CIMMYT

Fuente. O’Leary (2016).

Los agricultores por su parte, mediante sus experiencias y capacitaciones brindadas por entes públicos, dominan en cierta parte el procedimiento de mejoramiento vegetal en el cultivo de maíz, principalmente se tiene en cuenta que la polinización cruzada de diversas variedades van a afectar una posterior siembra de aquellas semillas, se realiza selección minuciosa de la semilla de los elotes, priorizando las que se ubican en el medio de estas, descartando las que se encuentran en las puntas y la base de la misma (Gómez, 2019).

2.7. Diversidad en maíz a través de marcadores moleculares

La diversidad genética en maíz se puede estudiar a nivel morfológico, bioquímico y molecular. No obstante, a nivel molecular por medio de marcadores, hay ciertas ventajas en lo particular sobre los demás estudios, por motivos de que muestran en detalle las diferencias genéticas de forma más rápida y sin ninguna influencia ambiental (De Souza et al., 2008; Saker et al., 2005). Los marcadores moleculares son herramientas biotecnológicas, permiten hacer comparaciones directamente con la similitud de genotipos y características de sus poblaciones a nivel de ADN, empleando un gran número de loci polimórficos, en un conjunto de genotipos se puede revelar grupos heteróticos o divergentes, de esta forma se evita una creciente uniformidad en el germoplasma de élite, con el fin de asegurar ganancias de selección a largo plazo (Catalán et al., 2019; Prasanna & Hoisington, 2003).

Según Eguiarte et al. (2013) y Azofeifa (2006), los marcadores a nivel molecular emplean diversas técnicas y algunos ejemplos son los siguientes:

- Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)
- Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD)
- Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)
- Microsatélites o Secuencias simples repetidas (SSR)
- Amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites (RAMPO)
- Inter-Secuencias simples repetidas (ISSR)

2.7.1. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Esta técnica a nivel molecular se caracteriza por la producción de fragmentos de ADN por medio del uso de enzimas de restricción, a fin de detectar polimorfismos en los sitios de corte, lo cual se reflejan como una variación en la longitud de los fragmentos que se generaron. Otra de sus grandes

características es que son codominantes, por ende logran la detección tanto de individuos homocigotos como heterocigotos (Rocha, 2003).

2.7.2. Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD)

La utilización de marcadores moleculares de tipo RAPD, amplifica aleatoriamente segmentos de ADN en una gran variedad de especies, y se basan principalmente en la posible estadística de que se presenten sitios adicionales al oligonucleótido de 10 pares de bases a lo largo del genoma (Alcántara, 2007). Esta técnica es muy utilizada como marcadores heredables, debido a la estimación de la estructura y diversidad genética, sobre todo en la diferenciación de especies sumamente similares y para inferir filogenias (Ríos et al., 2009).

2.7.3. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)

La técnica molecular AFLP consiste en la digestión íntegra del ADN genómico total con enzimas de restricción, seguido de la amplificación selectiva de las fracciones obtenidas para la detección de polimorfismos debido a alguna mutación en la secuencia de ADN o cerca de los sitios de restricción y finalmente en el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida de los fragmentos que fueron amplificados (Sansores, 2012).

2.7.4. Microsatélites o Secuencias simples repetidas (SSR)

Los microsatélites o secuencias simples repetidas, conocido comúnmente por sus siglas SSR, son estructuras habituales dentro del genoma y se distribuyen de forma aleatoria, están compuestas por repeticiones de grupos de uno a cuatro nucleótidos y contienen un alto polimorfismo por locus, lo que lo hace ser codominante, numeroso y de alta reproducibilidad, de modo que muestran un alto grado de variabilidad, esto lo convierte en un marcador idóneo para los mapeos genéticos y físico de genomas, ya que distinguen y discriminan genotipos para estudios de genética (Pérez Almeida et al., 2011; Povh et al., 2008).

2.7.5. Inter-Secuencias simples repetidas (ISSR)

Los Inter-Secuencias simples repetidas, conocidos por sus siglas como ISSR, son la unión de los marcadores SSR y AFLP, debido a que integra sus ventajas y enlaza la universalidad de los RAPD, por lo que no es necesario conocer de manera previa la secuencia del genoma en estudio (Vargas, 2011), y orienta a patrones multiloci altamente polimórficos (Zamani et al., 2015). Este tipo de marcador molecular es semiarbitrario, lo que significa que se amplifica por medio de un iniciador complementario y permite la obtención de los niveles de variación en las regiones microsatélite que se localizan dispersas en varios genomas, especialmente el nuclear (Medrano et al., 2017; Vásquez & Serrano, 2020). Tiene una amplia utilidad en estudios de diversidad genética, filogenia, identificación de genes, mapeo genético, introgresión e hibridación y distinción de individuos con origen clonal y sexual (González & Aguirre, 2007).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación o localización del trabajo

El trabajo de investigación fue realizado en la provincia de El Oro, con una división política de 14 cantones ubicada al sur de la costa ecuatoriana, con una superficie de 6188 km² y altitud de 100-1000 msnm, perteneciente a la zona del Ecuador (Matute et al., 2017).



Figura 5. Mapa político de El Oro

Fuente. Dirección de Planificación - GPP (2007)

3.2. Materiales

3.2.1. Material de campo

Se utilizaron 79 accesiones de maíz recolectadas en la provincia de El Oro, las cuales fueron obtenidas del banco de germoplasma del Semillero de Investigación en Recursos Fitogenéticos (SIRF), perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala: SIRF_01, SIRF_02, SIRF_03, SIRF_04, SIRF_05, SIRF_06, SIRF_07, SIRF_08, SIRF_09, SIRF_10, SIRF_11, SIRF_12, SIRF_13, SIRF_14, SIRF_15, SIRF_16, SIRF_17, SIRF_18, SIRF_19, SIRF_20, SIRF_21, SIRF_22, SIRF_23, SIRF_24, SIRF_25, SIRF_26,

SIRF_27, SIRF_28, SIRF_29, SIRF_30, SIRF_31, SIRF_32, SIRF_33, SIRF_34, SIRF_35, SIRF_36, SIRF_37, SIRF_38, SIRF_39, SIRF_40, SIRF_41, SIRF_42, SIRF_43, SIRF_44, SIRF_45, SIRF_46, SIRF_47, SIRF_48, SIRF_49, SIRF_50, SIRF_52, SIRF_53, SIRF_54, SIRF_55, SIRF_57, SIRF_58, SIRF_59, SIRF_60, SIRF_62, SIRF_63, SIRF_64, SIRF_65, SIRF_66, SIRF_67, SIRF_68, SIRF_69, SIRF_70, SIRF_71, SIRF_72, SIRF_73, SIRF_74, SIRF_75, SIRF_76, SIRF_77, SIRF_78 y SIRF_79.



Figura 6. Accesiones de maíz del banco de germoplasma del SIRF.

Fuente. El autor.

3.3. Método de evaluación

3.3.1. Evaluación en campo

La siembra del material vegetal se realizó en el último trimestre del año 2020, para el cual se elaboró un diseño de campo para la realización de la siembra, de modo que se aproveche el espacio de las plantas para evitar un posible estrés o ataque por alguna plaga. Cada accesión fue sembrada por fila, con el fin de evitar inconvenientes con las características de otras accesiones, pudiendo mermar el desarrollo de la misma.

3.3.1.1. Toma de muestras

Una vez que las plantas alcanzaron el desarrollo adecuado, en la etapa de crecimiento vegetativo, se tomaron las muestras de hojas frescas de las diversas accesiones, las cuales fueron tomadas de forma aleatoria, mediante un esquema de toma de muestras en diagonal. Para el muestreo del material vegetal, se seleccionaron hojas sanas, libres de daño por insectos o agentes mecánicos, y estrés climático. Posteriormente las muestras de hojas fueron ubicadas en bolsas de plástico ziploc, de modo que evite su transpiración, luego se etiquetaron y adicionalmente se le añadió gel de sílice, con el fin de preservar y proteger los ejemplares de la humedad u otro factor que afecte su representatividad (Gonzalez & Arenas, 2017).

3.4. Análisis en laboratorio

Las muestras fueron enviadas al laboratorio de identificación molecular (IDgen), precautelando la seguridad de las muestras, sobre todo en su transporte, por lo que se debe tener en cuenta que la temperatura no supere los 4-6 °C dentro de las 24 horas subsiguientes y no exponerlas a altas temperaturas ya que los resultados de los análisis se verían afectados.

3.4.1. Extracción de ADN

La metodología utilizada fue la de extracción de ADN de acuerdo al protocolo propuesto por Doyle & Doyle (1990), esta extracción consistió en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula (Alejos et al., 2014).

3.4.2. Cebadores ISSR

Se utilizaron 10 cebadores ISSR (Cuadro 1) para la amplificación del ADN, mediante el proceso de la técnica de PCR con un volumen de reacción de 40 ng/ul de solución para cada muestra.

Tabla 1. Cebadores ISSR, secuencia genética y temperatura empleada en la caracterización molecular. G: guanina; A: adenina; C: citosina; Y: citosina o timina.

Cebador	Secuencia	Temperatura (°C)
UBC811	5' GAGAGAGAGAGAGAGAC 3'	43.3
UBC827	5' ACACACACACACACACG 3'	54.9
UBC834	5' AGAGAGAGAGAGAGAGYT 3'	56.5
UBC835	5' AGAGAGAGAGAGAGAGYC 3'	45.6
UBC841	5' GAGAGAGAGAGAGAGAYC 3'	46
UBC857	5' ACACACACACACACACYG 3'	53.7
UBC868	5' GAAGAAGAAGAAGAAGAA 3'	47.8
UBC873	5' GACAGACAGACAGACA 3'	45
14	5' AGAGAGAGAGAGAGAGC 3'	63.5
19	5' ACACACACACACACAC 3'	63.5

3.4.3. Amplificación del ADN y electroforesis

El procedimiento de amplificación fue mediante PCR y consistió en la aplicación de métodos convencionales con buffer extracción a base de fenol-cloroformo, utilizando 200 mg de muestras de hoja macerada mecánicamente. Las 79 muestras de ADN se diluyeron hasta una concentración de 40ng/ul y la amplificación se realizó mediante PCR convencional utilizando diez primers ISSR para análisis de polimorfismos. Los amplicones se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % por un período de 2 horas a voltaje de 120 V.

3.5. Análisis de datos

Se calculó una matriz de similitud por pares utilizando el coeficiente de Dice (1945). Esta matriz de similitud se empleó para construir un dendrograma por el método de grupos de pares no ponderados con promedios aritméticos (UPGMA) (Figura 3), utilizando los programas SAHN-

clustering y TREE-plot del software NTSYS-pc versión 2.2 (Rohlf, 2009). A partir de la matriz de similitud se derivó una matriz cofenética para comprobar la bondad del ajuste de los clúster, comparando las dos matrices mediante la prueba de correspondencia matricial de Mantel (1967) en el programa MXCOMP del paquete NTSYS-pc, utilizando 10.000mi permutaciones aleatorias. Por otra parte, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA), el cual una técnica de análisis multivariante que permite ordenar las accesiones en un espacio de dos o tres dimensiones en función de las distancias genéticas entre ellas (Gotelli & Ellison, 2004), además de visualizar de mejor forma los resultados obtenidos en el análisis de agrupamiento. Así, la matriz de similitud de Dice se transformó en una matriz de distancias ($D = 1-S$), que se utilizó con los programas DCENTER y EIGEN de NTSYS-pc, y luego para generar los gráficos correspondientes en dos y tres dimensiones con los programas MXPLOT y MOD3D, respectivamente, también incluidos en el paquete de programas NTSYS-pc.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Amplificación PCR y polimorfismo

Los patrones de bandas obtenidos con diez cebadores ISSR se analizaron para estimar las relaciones genéticas entre las 79 accesiones de maíz. Dado que las bandas ISSR son marcadores dominantes, éstas se puntuaron como caracteres dialélicos, ya sea como 1 (presente) o 0 (ausente). Se obtuvo ADN genómico para la amplificación de los cebadores ISSR mediante PCR convencional y se obtuvieron bandas polimórficas de las muestras (Figura 5.), el tamaño de los fragmentos oscilaban entre 100 a 10 000bp. Sin embargo, tres de los cebadores no fueron informativos, de modo que los restantes indicaron la presencia de siete genotipos en maíz con cantidad regular de polimorfismo (Tabla 1).

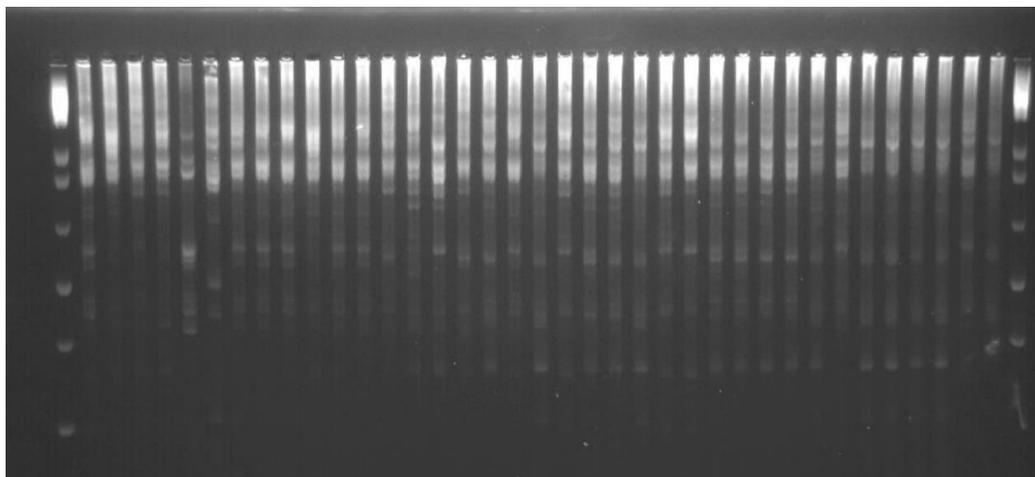


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 2 % teñido con Bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular 100 bp generuler Invitrogen., muestras de maíz 1-37. ISSR (GA) 9C.

Tabla 2. Número de polimorfismo y genotipos de maíz mediante PCR convencional

Espece	Muestra	Número de polimorfismo	Genotipo
Maíz	4, 14, 17, 23, 27, 36, 37	3	1M

	13, 15, 21, 22, 26, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52	2	2M
	5, 16, 18, 28, 31, 39, 48	4	3M
	1, 2, 19, 25, 29, 38, 41, 45	3	4M
	3, 11, 12, 20, 32, 33, 43	2	5M
	6, 7, 9, 17, 30, 34, 42, 44	3	6M
	8, 10, 24, 31, 35, 40	2	7M

En el análisis de los cebadores, fueron ocho los que se integraron por los dinucleótidos (AG)₈, (AC)₈ y (GA)₈, sólo un trinucleótido (GAA)₆, al igual que el tetranucleótido (GACA)₄. Siete de los dinucleótido presentaron anclaje (C, YT, YC y YG) en el extremo 3'. En relación al cuadro anterior, con un genotipo las muestras de las accesiones desde SIRF 4 hasta SIRF 37 mostraron 3 número de polimorfismos, mientras que en el segundo genotipo desde SIRF 13 hasta SIRF 52, se visualizaron 2, el tercer genotipo de SIRF 5 hasta SIRF 48 mostraron 4, el cuarto genotipo desde SIRF 1 hasta SIRF 45 mostraron 3, el quinto genotipo de SIRF 3 hasta SIRF 43 se visualizó 2, el sexto genotipo desde SIRF 6 hasta SIRF 44 indicó 3, por último el séptimo genotipo desde SIRF 8 hasta SIRF 40 mostró 2 números de polimorfismo. En total se obtuvieron 19 fragmentos polimórficos en total. Los patrones de banda evalúan la diversidad genética e identifica qué accesiones presentan caracteres deseables (Idris et al., 2012). Estudios realizados por Devraj et al. (2015), demuestra que la utilización de cebadores ISSR generan una amplia gama de loci polimórficos.

4.2. Análisis de conglomerados o clúster

La utilización de marcadores ISSR lograron determinar altas diferencias entre las 79 accesiones de maíz analizadas, mediante el dendrograma de similitud realizado (Figura 5) se demostró que

existe una alta diversidad genética, por lo que mostró una correlación cofenética baja ($r=0.3$), según Ayala et al. (2011), el valor de la correlación debe ser cercano a 1 para una mejor calidad de las muestras.

Se observa que con un coeficiente de correlación cofenética de 0.32, las accesiones evaluadas forman seis grupos principales. El primer grupo lo integraron las que mostraron alta divergencia, entre ellas SIRF 62, SIRF 52 y SIRF 37. Sin embargo, el segundo grupo fue el que presentó la accesión más divergente entre todas, integrada únicamente por SIRF 20. El tercer grupo está formado por dos subgrupos, el primero lo compone SIRF 22, SIRF 23 y SIRF 21, el segundo subgrupo está establecido por dos únicas accesiones SIRF 38 y SIRF 07. El cuarto grupo lo constituyen dos subgrupos, en el primero se ubica desde SIRF 66 hasta SIRF 64, el segundo subgrupo lo conforman varias asociaciones y está compuesto desde SIRF 79 hasta SIRF 17. El quinto grupo se estableció desde la accesión SIRF 60 hasta SIRF 53. El sexto y último grupo está conformado por la mayoría de las accesiones, formando dos grandes subgrupos, el primero lo integran varias asociaciones y está establecido desde SIRF 46 hasta SIRF 16, el segundo gran subgrupo está constituido desde SIRF 30 hasta SIRF 01.

Los genotipos que presentaron una mayor discrepancia en cuanto a su variabilidad, se puede deber a varios factores, principalmente a las condiciones que estas requieren para su óptimo desarrollo y a las características que presentan actualmente. Sin embargo, existió una mayor similitud genotípica representada por las accesiones SIRF 18 y SIRF 19 las cuales están juntas en un mismo clúster con un coeficiente de correlación de 0.85, y SIRF 48 y SIRF 50 que presentaron un coeficiente de 0.83. Esto quiere decir que se debe tener cautela al momento de utilizar aquellas accesiones para programas de mejoramiento vegetal y conservación de especies.

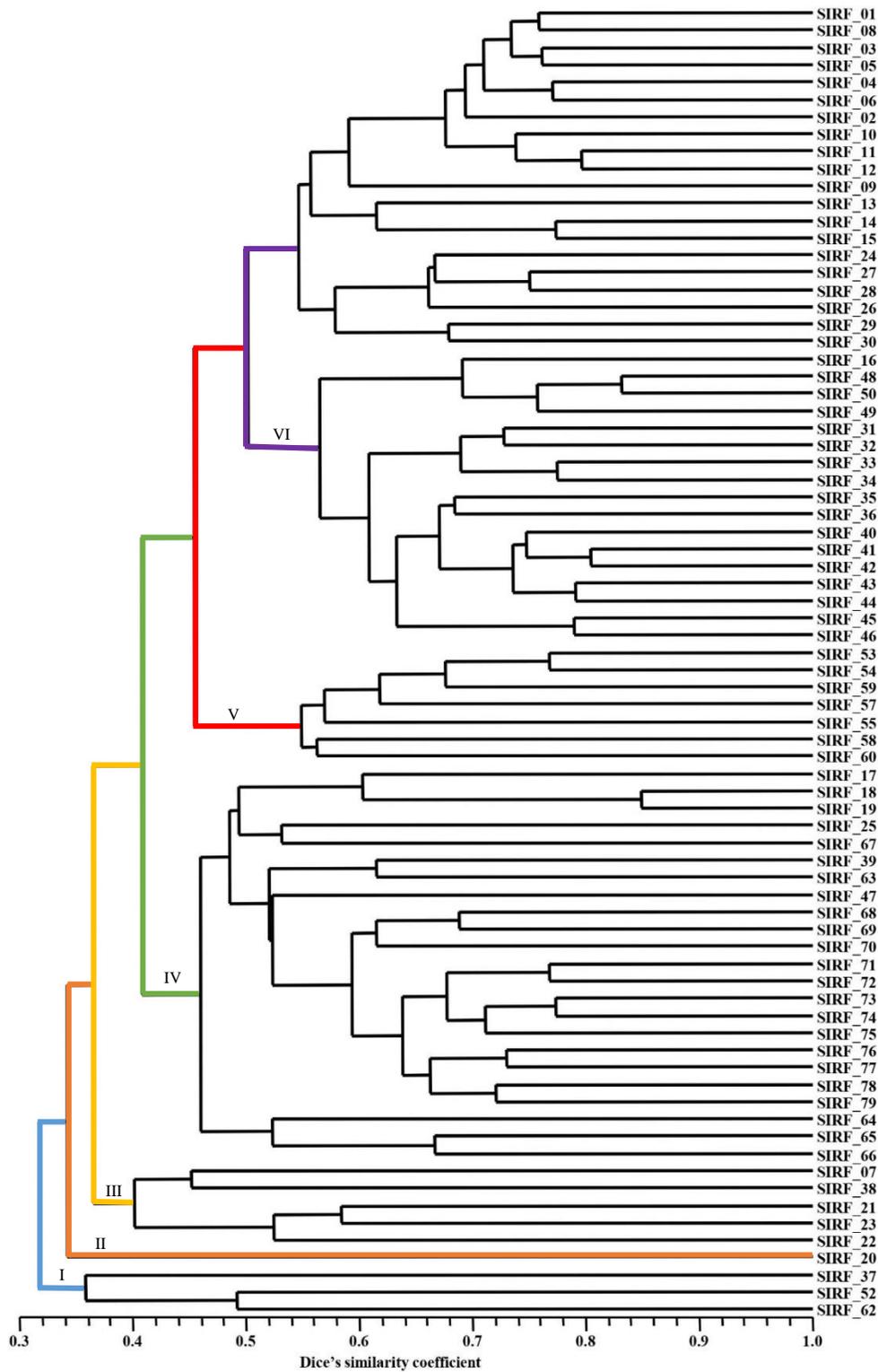


Figura 8. Dendrograma representativo de la diversidad genotípica entre 79 accesiones de maíz, construidos a partir de una matriz de similitud por pares utilizando el coeficiente de Dice (1945).

Los genotipos que presentaron la mayor divergencia de similitud fue SIRF 20 con un coeficiente de correlación de 0.34, y SIRF 37 con un coeficiente de 0.36 asociándose con SIRF 52 y SIRF 62. Esto quiere decir que aquellas accesiones poseen alto potencial de diversidad genética, sobre todo para establecer programas de conservación y de mejoramiento vegetal. Los resultados de relaciones genéticas en el cultivo de maíz, obtenidos por Guzmán & Legaria (2020), estuvieron relacionados básicamente a patrones altitudinales y geográficos, sin embargo una parte compartió aspectos genéticos, morfo agronómicos, de distribución y usos. Los genotipos que se ubican en diferentes clúster deben ser considerados para programas de fitomejoramiento, mientras que los que se ubican en un mismo grupo están más relacionados por la similitud que presentan, de modo que se debe tener cuidado al utilizar aquellas accesiones (Muhammad et al., 2017).

4.3. Análisis de coordenadas principales

El análisis de coordenadas principales en el plano de dos dimensiones, mostró una alta separación de las 79 accesiones de maíz (Figura 6). En el cuadrante positivo de la coordenada 1 y negativo de la coordenada 2, fue donde la mayor parte de las accesiones se ubicaron, seguido del cuadrante negativo de la coordenada 1 y negativo de la coordenada 2. Mientras exista una mayor variabilidad entre ellas, se corrobora un bajo polimorfismo del acervo genético (García, 2020). Según Hernández et al. (2017), mencionan que los puntos cerca del cuadrante positivo de la coordenada 1 y negativo de la coordenada 2, significa que existe un mayor grado de mejoramiento con respecto a los que están ubicados en la parte superior positiva de la coordenada 2, resultando ser más conservadoras en cuanto a sus características de origen. Es preciso destacar que las accesiones que presentaron mayor divergencia en el dendrograma SIRF 37, SIRF 52, SIRF 62 y SIRF 20, en cuanto al análisis de coordenadas principales se observaron distantes entre sí, a excepción de SIRF 37 y 62 que se ubicaron en el cuadrante positivo de la coordenada 1 y negativo de la coordenada

2, SIRF 20 se ubicó cerca. Sin embargo, SIRF 52 fue la que más disimilitud presentó con relación a las demás accesiones al igual que SIRF 68, SIRF 55 y SIRF 28, todas en cuadrantes diferentes. No obstante, SIRF 17, SIRF 25, SIRF 30, SIRF 07 y SIRF 26 fueron las que tuvieron un mayor grado de similitud a excepción de las demás. SIRF 18 y SIRF 19 que mostraron más similitud en el dendrograma se ubicaron en el mismo cuadrante, cerca de la coordenada 1 y negativo de la coordenada 2.

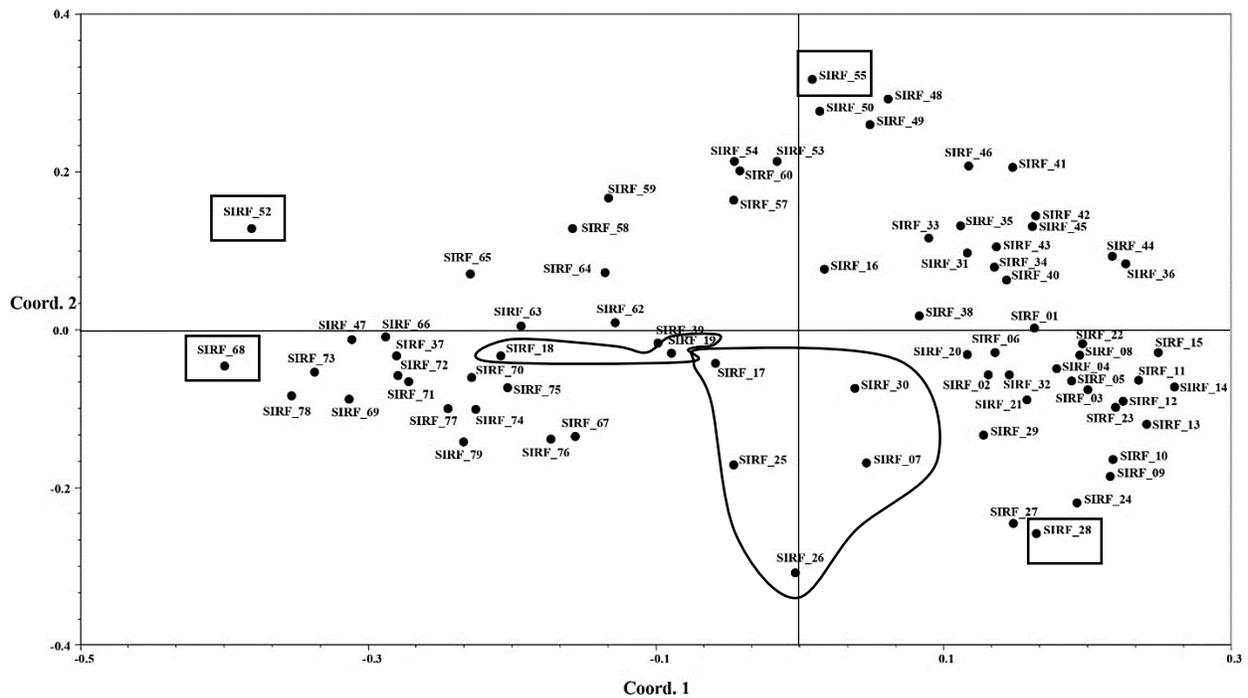


Figura 9. Distribución de las 79 accesiones de maíz del banco de germoplasma del SIRF, mediante un análisis de coordenadas principales (PcoA) en representación 2D de su similitud. El plano 3D (Figura 7), nos permite visualizar de mejor forma la variabilidad genética que existe entre las accesiones de estudio., del mismo modo se ratifica el plano bidimensional con respecto a SIRF 52, SIRF 55, SIRF 68 y SIRF 28 que se mantenían distantes en sus cuadrantes, de igual modo se comprueba que SIRF 17, SIRF 25, SIRF 30, SIRF 07 y SIRF 26 son las que se encuentran con un mayor mejoramiento con respecto a las demás. Sin embargo como se mencionó anteriormente

las accesiones que aún conservan sus características de origen son las que más se alejan de las demás.

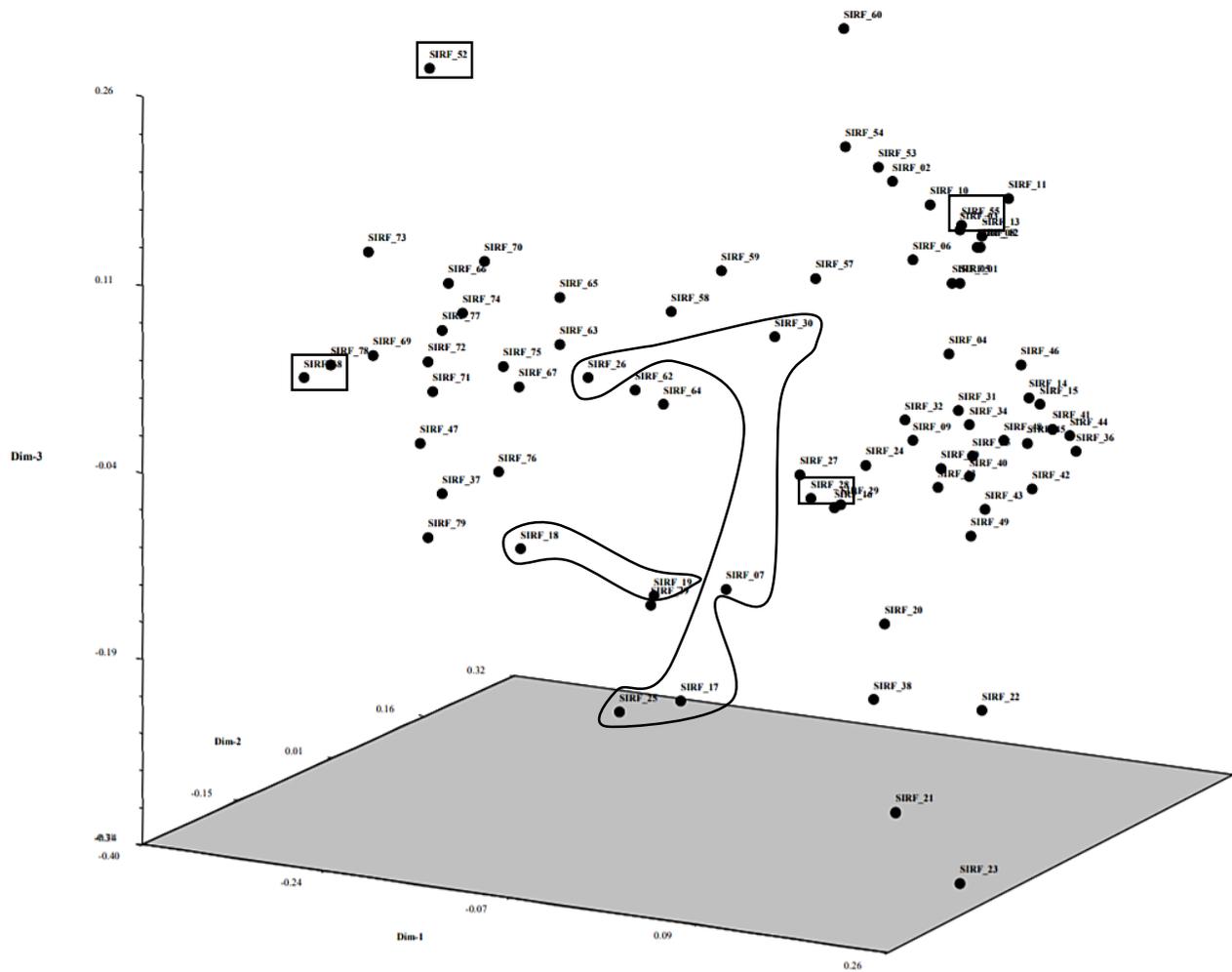


Figura 10. Análisis de coordenadas principales (PcoA) en representación 3D de la similitud de las 79 accesiones de maíz.

5. CONCLUSIONES

La diversidad genética dentro de las 79 accesiones de maíz, presentó una alta divergencia, resaltando a SIRF 18 y SIRF 19 como las que presentaron mayor similitud con un alto coeficiente, mientras que SIRF 62, SIRF 52, SIRF 37 y SIRF 20 son las de mayor disimilitud en comparación a las demás. No obstante, en la corroboración de resultados, únicamente SIRF 52 sigue siendo una accesión discriminante junto a SIRF 55, SIRF 68 y SIRF 28.

Los resultados de variabilidad que existen dentro del banco de germoplasma del SIRF, sugieren la conservación de aquellas accesiones, sobre todo las que presentaron mayor disimilitud, a fin de realizar programas de mejoramiento genético en el cultivo de maíz.

6. RECOMENDACIÓN

Estos materiales deben tratar de estudiarse más a fondo con otro tipo de marcadores moleculares, con la finalidad de poder definir su posible uso en programas de fitomejoramiento, ya que demuestran ser genéticamente aptas para este tipo de trabajos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alcántara, M. R. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. In *Ecología molecular* (pp. 541–566).
- Alemán Pérez, R. D., Ortiz Tenemaza, R. V., Domínguez Brito, J., Bravo Medina, C. A., Alba Roja, J. L., Rodríguez Guerra, Y., Pico Angulo, C., & Freile Almeida, J. (2020). Desarrollo productivo de dos variedades locales de maíz (*Zea mays* L.) con la aplicación de fertilizante mineral y orgánico en la Amazonía Ecuatoriana. *Ciencia y Tecnología*, 13(1), 9–16. <https://doi.org/10.18779/cyt.v13i1.343>
- Anderson, E., & Cutler, H. (1942). Races of *Zea mays*: I. Their recognition and classification. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 29, 69–89.
- Arias Vargas, Y., González Marquetti, I., Miranda Cabrera, I., Fernández Granda, L., & Delgado-Oramas, B. P. (2018). Diversidad genética en maíz (*Zea mays* L.) procedente de Pinar del Río y Guantánamo, Cuba, mediante el empleo de RAPD. *Revista de Protección Vegetal*, 33(1), 1–9.
- Ayala Cabrera, D., Pérez García, R., Izquierdo, J., & Herrera, M. (2011). *Aplicación de técnicas de Análisis Inteligente de Datos para el catastro de sistemas de abastecimiento de agua mediante georadar (GPR)* (p. 10).
- Ayala Durán, C. (2019). Tecnología y Política Pública: El apoyo oficial a la semilla de maíz híbrida en El Salvador. *Estudios Del Desarrollo Social: Cuba y América Latina*, 8(2), 271–280.
- Azofeifa Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221–242.
- Baca, L. A. (2016). *La producción de maíz amarillo en el Ecuador y su relación con la soberanía alimentaria*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

- Barrera-Guzmán, L. A., Legaria-Solano, J. P., & Ortega-Paczka, R. (2020). Diversidad Genética En Poblaciones De Razas Mexicanas De Maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 43(1), 121. <https://doi.org/10.35196/rfm.2020.1.121>
- Castillo-Nonato, J. (2016). Conservación de la diversidad del maíz en dos comunidades de San Felipe del Progreso, Estado de México. *Agricultura Sociedad y Desarrollo*, 13(2), 217. <https://doi.org/10.22231/asyd.v13i2.327>
- Catalán, F., Blas, R., Catalán, W., & Cosio, P. (2019). *Cuarto congreso peruano de mejoramiento genético y biotecnología agrícola* (Universida).
- Cervantes Adame, Y. F., Castillo Gutiérrez, A., Carapia Ruiz, V. E., Andrade Rodríguez, M., Nuñez Valdéz, M. E., Villegas Torres, O. G., Perdomo Roldán, F., Suárez Rodríguez, R., & López Santillán, J. A. (2016). Variabilidad genética y asociación morfológica entre poblaciones nativas de maíz y sus cruza F1. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(8), 1919–1931.
- CIMMYT. (2017). *Cómo un banco de germoplasma en México genera datos para ayudar a aliviar la pobreza*. CIMMYT International Maize and Wheat Improvement Center. <https://www.cimmyt.org/es/uncategorized/como-un-banco-de-germoplasma-en-mexico-genera-datos-para-ayudar-a-aliviar-la-pobreza/>
- Coral Valenzuela, J. V. (2017). *Caracterización morfológica y agronómica de dos genotipos de maíz (Zea mays l.) En la zona media de la parroquia Malchinguí*. Universidad Central del Ecuador.
- Costich, D., & Zavala, C. (2017). *Resultados de conservación ex situ-in situ del maíz Jala* (p. 21).
- De Souza, S. G. H., Carpentieri-Pípolo, V., De Fátima Ruas, C., De Paula Carvalho, V., Ruas, P. M., & Gerage, A. C. (2008). Comparative analysis of genetic diversity among the maize

- inbred lines (*Zea mays* L.) obtained by RAPD and SSR markers. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(1), 183–192. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132008000100022>
- Delgado Hernández, J. (2018). *Evaluación agronómica, morfológica y aptitud harinera de variedades tradicionales de maíz (Zea mays L.)*. Universidad de La Laguna.
- Deras Flores, H. (2020). *Guía técnica: el cultivo de maíz* (Instituto). <https://repositorio.iica.int/handle/11324/11893>
- Devraj, L., Swapan, K. T., Ramesh, K., Meenakshi, B., & Rajesh, R. (2015). Assessment of genetic diversity in quality protein maize(QPM) inbreds using ISSR markers. *Journal of Environmental Biology*, 36(4), 985–992.
- Deza, J., & Delgado de la flor, F. (2018). Cambios ambientales y domesticación de tuberosas y gramíneas. *Ciencia y Desarrollo. Universidad Alas Peruanas*, 21(2), 89–101. <https://doi.org/10.21503/CienciayDesarrollo.2015.v18i2.05>
- Dice, L. R. (1945). Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species. *Ecology*, 26(3), 297–302. <https://doi.org/10.2307/1932409>
- Doyle, J. ., & Doyle, J. . (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(13), 39–40.
- Dzib Aguilar, L. A., Ortega Paczka, R., & Segura Correa, J. C. (2016). Conservación in situ y mejoramiento participativo de maíces criollos en la Península de Yucatán. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*.
- Eguiarte, L. E., Aguirre Liguori, J. A., Jardón Barbolla, L., Aguirre Planter, E., & Souza, V. (2013). Genómica de poblaciones: nada en evolución va a tener sentido si no es a la luz de la genómica, y nada en genómica tendrá sentido si no es a la luz de la evolución. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 16(1), 42–56.

- Farinango Chushig, V. A. (2015). *Evaluación fitosanitaria y potencial agronómico de las variabilidad de maíz de Cotacachi y Saraguro en las principales zonas maiceras de Imbabura y Loja*.
- García Marín, E. (2020). *Análisis de marcadores moleculares para la diferenciación varietal en semillas de tomate (Solanum lycopersicum L.)*. Universitat Politècnica de Valencia.
- Giustina, L. Della, Brandini Rossi, A. A., Vieira, F. S., Tardin, F. D., Neves, L. G., & Santana Pereira, T. N. (2017). Variabilidade genética em genótipos de teca (*Tectona grandis* Linn. F.) baseada em marcadores moleculares ISSR e caracteres morfológicos. *Ciência Florestal*, 27(4), 1311–1324.
- Gómez Martínez, E. (2019). *Mejoramiento del maíz nativo para autoconsumo*. Universidad Autónoma Chapingo.
- González, A., & Aguirre, X. (2007). Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs). In *Ecología molecular2* (Universida, pp. 567–571).
- Gonzalez, M. ., & Arenas Castro, H. (2017). *Recolección de tejidos biológicos para análisis genéticos*. (p. 33). Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Gotelli, N. ., & Ellison, A. . (2004). A primer of ecological statistics (Vol. 1). *Sunderland: Sinauer Associates., I*.
- Guzmán, B., & Legaria, J. (2020). Genetic relationships in accessions of mexican maize races (*Zea mays* L.). *Agroproductividad*, 13(2), 3–9.
<https://doi.org/https://doi.org/10.32854/agrop.vi.1642> Genetic
- Hernández Ramos, M. A., Rodríguez Larramendi, L. A., Guevara Hernández, F., Rosales Esquinca, M. de los Á., Pinto Ruíz, R., & Ortíz Pérez, R. (2017). Caracterización molecular

- de maíces locales de la reserva de la Biosfera La Sepultura, México. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 69–83. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.21612>
- Herrera Bernadac, M., Ávalos Hernández, Á., & López Rodríguez, A. (2020). Más allá de la domesticación del maíz. *Novedades Científicas*, 71(1), 64–71.
- Hryczyński, E., Díaz Yanevich, C. E., Orlando Brachna, D., Gustavo López, W., Díaz Yanevich, M. A., & Máximo Bertoia, L. (2020). Interacción de germoplasma de maíz en diferentes localidades y ambientes de la Provincia del Chaco. *Avances En Energías Renovables y Medio Ambiente*, 24, 288–298.
- Idris, A. E., Hamza, N. B., Yagoub, S. O., Ibrahim, A. I., & El-Amin, H. K. (2012). Maize (*Zea mays* L.) Genotypes Diversity Study by Utilization of Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(10), 42–47.
- López-Báez, L. I., Taboada-Gaytán, O. R., Gil-Muñoz, A., López, P. A., Ortiz-Torres, E., Vargas-Vázquez, M. L. P., & Díaz-Cervantes, R. (2018). Morpho-agronomic diversity of the runner bean in the central-eastern highland plateau of Puebla. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41(4), 487–497.
- Mantel, N. (1967). The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Research*, 27(2), 209–220. <https://doi.org/10.1021/j150334a020>
- Márquez, J. (2020). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua, 2019* (p. 14).
- Matute, A., Mora, J., & Mora, R. (2017). Ventajas y desventajas del cambio de la matriz productiva y su incidencia en el sector cafetero de la provincia de El Oro. *Revista Tecnológica Espol*, 30(1), 79–99. <http://www.rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/view/575>
- Medrano-Hernández, J. M., Rodríguez de la O, J. L., Reyes-Trejo, B., & Peña-Ortega, M. G. (2017). Molecular characterization using ISSR primers of *Magnolia mexicana* DC. from two

- regions in Zongolica, Veracruz, Mexico. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 23(3), 427–436. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2017.03.019>
- Merchán, M. A., Caicedo, M. I. T., & Torres, A. K. D. (2017). Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Revista Habanera de Ciencias Medicas*, 16(5), 796–807.
- Morales Da Silva, R. A. (2017). *Diversidade de acessos de maxixe (Cucumis anguria L.) do norte-nordeste brasileiro*. Universidade Federal Rural Do Semiárido.
- Morales Fernández, G. R. (2016). *Caracterización agromorfológica de 80 accesiones de maíz (zea mays) del banco de germoplasma de la Universidad Tecnica de Cotopaxi en el centro experimental agropecuario Salache alto ceasa utc*. Universidad Técnica de Cotopaxi.
- Morales, L. R. (2016). *Eficiencia de marcadores RAPD e ISSR, en la identificación de especies de Tigridia spp.* Universidad Autónoma del Estado de México.
- Muhammad, R. W., Qayyum, A., Ahmad, M. Q., Hamza, A., Yousaf, M., Ahmad, B., Younas, M., Malik, W., Liaqat, S., & Noor, E. (2017). Characterization of maize genotypes for genetic diversity on the basis of inter simple sequence repeats. *Genetics and Molecular Research*, 16(1), 1–9. <https://doi.org/10.4238/gmr16019438>
- O’Leary, M. (2016). *Maíz: De México para el mundo*. CIMMYT International Maize and Wheat Improvement Center. [https://www.cimmyt.org/es/uncategorized/maiz-de-mexico-para-el-mundo/#:~:text=La diversidad%3A corazón del maíz mexicano&text=Los antiguos agricultores seleccionaban el,59 variedades criollas mexicanas únicas.](https://www.cimmyt.org/es/uncategorized/maiz-de-mexico-para-el-mundo/#:~:text=La%20diversidad%3A%20corazón%20del%20maíz%20mexicano&text=Los%20antiguos%20agricultores%20seleccionaban%20el,59%20variedades%20criollas%20mexicanas%20únicas.)
- Pérez-madruga, Y., Rosales-Jenquis, P. R., Costales-Menéndez, D., & Falcón-Rodríguez, A. (2019). Combined application of chitosan and AMF in corn yield. *Cultivos Tropicales*, 40(4).
- Pérez Almeida, I., & García Mendoza, P. J. (2020). Aportes de la biotecnología al mejoramiento

del maíz. *Revista Peruana de Innovación Agraria*, 1(1), 130–150.

- Pérez Almeida, I., Torres, E., Angulo, L., & Acevedo, M. (2011). Diversidad genética entre cultivares de arroz de Venezuela con base a la estimación del coeficiente de parentesco y análisis con marcadores moleculares microsátélites (SSR). *Interciencia*, 36(7), 545–551.
- Pingarroni, A., Molina-Garay, C., Rosas-Osorio, C., Alfonso-Corrado, C., Clark-Tapia, R., Monsalvo-Reyes, A., & Campos, J. E. (2020). Abundancia y diversidad genética de *Quercus mulleri*, especie microendémica amenazada de Oaxaca. *Madera y Bosques*, 26(1).
<https://doi.org/10.21829/myb.2020.2611782>
- Povh, J. A., Lopera Barrero, N. ., Ribeiro, R. ., Lupchinski Jr, E., Gomes, P. ., & Lopes, T. . (2008). Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35(1), 5–15.
- Prasanna, B. M., & Hoisington, D. (2003). Molecular breeding for maize improvement: An overview. *Indian Journal of Biotechnology*, 2(1), 85–98.
- Ramalho, A. B., Rossi, A. A. B., Dardengo, J. F. E., Zortéa, K. É. M., Tiago, A. V., & Martins, K. C. (2016). Diversidade genética entre genótipos de *Bertholletia Excelsa* por meio de marcadores moleculares issr. *Floresta*, 46(2), 207–214.
<https://doi.org/10.5380/rf.v46i2.41970>
- Reyes Morales, L. (2016). *Eficiencia de marcadores RAPD e ISSR, en la identificación de especies de Tigridia spp.* [Universidad Autónoma del Estado de México].
<http://hdl.handle.net/20.500.11799/65812>
- Rimieri, P. (2017). La diversidad genética y la variabilidad genética: dos conceptos diferentes asociados al germoplasma y al mejoramiento genético vegetal. *Journal of Basic and Applied Genetics*, XXVIII(2), 7–13.

- Ríos, E., Mejía-ruiz, H., & Álvarez Castañeda, S. T. (2009). Marcadores moleculares: una revolución en la zoología. *Comunicaciones Libres*, 5–13.
- Rocha S, P. J. (2003). Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección genética de palma de aceite. *Revista Palmas*, 5(9), 11–25.
- Rohlf, F. J. (2009). *NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.2* (p. 44). State University of New York.
- Ruiz Hernández, V. C., Legarías Solano, J. P., Sahagún Castellanos, J., & De la O Olan, M. (2018). Variabilidad genética en algunas especies cultivadas y silvestres de amaranto. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(2), 405–416. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i2.1081>
- Saker, M. M., Youssef, S. S., Abdallah, N. A., Bashandy, H. S., & El Sharkawy, A. M. (2005). Genetic analysis of some Egyptian rice genotypes using RAPD, SSR and AFLP. *African Journal of Biotechnology*, 4(9), 882–890. <https://doi.org/10.4314/ajb.v4i9.71227>
- Sansores Santos, N. B. (2012). *Desarrollo de marcadores SCAR a partir de AFLP en Agave tequilana*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
- Santana Robles, F., Granillo Macías, R., Espinoza Sánchez, F. I., Aguilar Ortega, J. C., & Ortega Zavala, J. G. (2018). Caracterización de la cadena de valor del maíz. *Ingenio y Conciencia Boletín Científico de La Escuela Superior Ciudad Sahagún*, 5(9). <https://doi.org/10.29057/ess.v5i9.2899>
- Simón, M. R., & Golik, S. I. (2018). *Cereales de verano* (Editorial). <https://doi.org/10.35537/10915/68613>
- Uribe Montes, L. C. (2015). *Evaluación preliminar de la diversidad genética de morfotipos de ibia (Oxalis tuberosa Mol.) en municipios de Ventaquemada y Turmequé (departamento de Boyacá) por medio de marcadores ISSR*. Pontificia Universidad Javeriana.

- Valdes, Y. B., Durañona, H., & Roca, A. (2016). Efecto De La Temperatura Y La Humedad En La Conservación De Granos De Maíz En Silos Metálicos Refrigerados. *Cultivos Tropicales*, 37(4), 105–114. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.13900.21127>
- Valverde, M. (2015). *Caracterización E Identificación De Razas De Maíz En La Provincia Del Azuay*.
- Vargas Ribera, P. R. (2011). *Análisis de la diversidad genética de 21 accesiones de piñón (Jatropha curcas L.) utilizando marcadores de tipo ISSR (Intermicrosatélites)*. Zamorano.
- Vásquez, S., & Serrano, R. (2020). CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE CLONES DE LA LIMA DULCE (Citrus atifolia) UTILIZANDO MARCADORES ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). *Investigaciones Agropecuarias*, 3(1), 62–70. <https://doi.org/10.48204/j.ia.v3n1a5>
- Vega-Alvarez, I., Santacruz-Varela, A., Rocandio-Rodríguez, M., Córdova-Téllez, L., López-Sánchez, H., Muñoz-Orozco, A., & Hernández-Bautista, A. (2017). Genetic diversity and structure of native maize races from Northwestern Mexico. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 52(11), 1023–1032. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2017001100008>
- Velázquez, L. P. A., MdCA, M., & Romero, A. C. (2014). Extracción y purificación de ADN. In *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (Instituto, pp. 1–25).
- Villanueva Ávalos, J. F., & Quero Carrillo, A. R. (2015). *Tripsacum spp.: Un recurso forrajero nativo, relegado en México* (J. F. Villanueva Ávalos (ed.); Instituto).
- Yáñez, C., Zambrano, J., & Caicedo, M. (2013). *Guía de Producción de maíz para pequeños agricultores y agricultoras* (p. 28).
- Yang, N., Xu, X. W., Wang, R. R., Peng, W. L., Cai, L., Song, J. M., Li, W., Luo, X., Niu, L.,

- Wang, Y., Jin, M., Chen, L., Luo, J., Deng, M., Wang, L., Pan, Q., Liu, F., Jackson, D., Yang, X., ... Yan, J. (2017). Contributions of *Zea mays* subspecies mexicana haplotypes to modern maize. *Nature Communications*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02063-5>
- Zamani, P., Akhondi, M., & Mohammadabadi, M. (2015). Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in sheep. *Small Ruminant Research*, 132, 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.10.018>
- Zhang, L., Liu, P., Zhang, A., Zheng, G., Xing, G., & Jia, J. (2019). Análisis de la diversidad genética de la setaria cola de zorra (*Setaria italica*) usando marcadores ISSR. *Agrociencia*, 53(2), 133–144.

8. ANEXOS



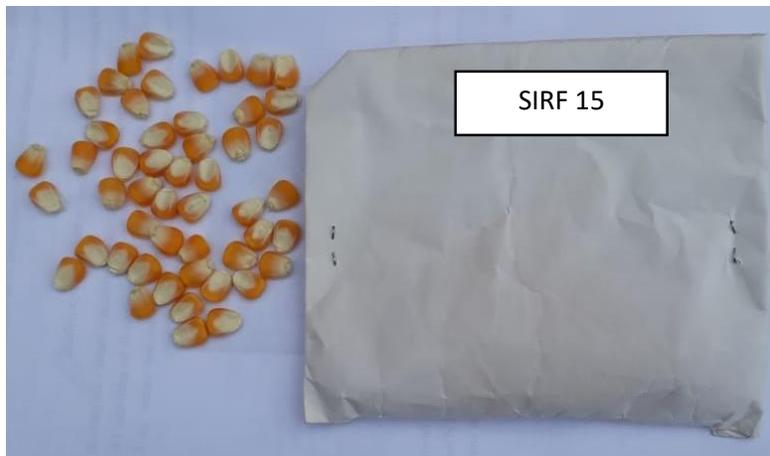
Anexo 1. Limpieza del terreno.



Anexo 2. Preparación del terreno.



Anexo 3. Elección de las accesiones para la siembra.



Anexo 4. Accesoión SIRF 15



Anexo 5. Emergencia de las plántulas.



Anexo 6. Desarrollo de las accesiones de maíz.



Anexo 7. Accesiones de maíz en óptimo estado para la toma de muestras.