

Caracterización molecular de las razas de canguil, tusilla y mezclas de maíz del banco de trabajo del programa de maíz del INIAP

Cristina Silva^a, Eduardo Morillo^b, Carlos Yáñez^b, Karina Proaño^c & Marco Taipe^c

^a Carrera de Biotecnología Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Sangolquí, Ecuador (cristinasilva.1989@outlook.com)

^b Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Estación Experimental Santa Catalina. Quito-Ecuador.

^c Carrera de Biotecnología Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Sangolquí, Ecuador.

Resumen— El maíz (*Zea mays* L.) debido a sus diversidad genética y a sus múltiples utilidades es un producto con alto interés de investigación en el país. Por esta razón, en la presente investigación se realizó el análisis de la variabilidad genética en este cereal. Se caracterizó molecularmente 86 accesiones pertenecientes al Banco de Trabajo del Programa de Maíz del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, determinándose la diversidad y estructura genética. Las muestras fueron genotipadas en el analizador de ADN LI-COR 4300s. Los análisis de diversidad genética revelaron un total de 72 alelos de los 9 locus en análisis, con un promedio de 8 alelos/locus. El locus *phi053* fue el más polimórfico. El PIC reportado fue de 0,58, la heterocigosidad esperada de 0,63 y la heterocigosidad observada de 0,46, siendo indicadores de la alta diversidad genética. El análisis de similitud UPGMA y el análisis de coordenadas principales PCO determinaron la falta de estructura genética en las muestras estudiadas. El análisis por razas canguil y tusilla reveló una diferencia genética de 7%, mientras que en comparación con los materiales mezclas de maíz presentan una diferencia genética del 4%. Con el análisis realizado se observó que la colección del Banco de Trabajo del Programa de Maíz posee diversidad genética, la mayor parte ocurre dentro de las poblaciones más que entre las razas.

Palabras claves: maíz, microsatélites, variabilidad, molecular.

I. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia en el Ecuador, tanto por ser uno de los componentes básicos en la dieta de la población como por la gran cantidad de terreno destinado a su producción [1]. Según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, para el 2011 la superficie cosechada de maíz (duro y suave) fue de 577.784 ha [2].

El maíz, además de tener relevancia en la alimentación e industria también se constituye como una fuente importante de diversidad genética, es así que se han reconocido en el Ecuador 29 razas, de las cuales 17 están ubicadas en la sierra ecuatoriana, mientras que las 12 razas restantes se ubican mayormente en la región litoral y la amazonia [3].

Lamentablemente, en las últimas décadas se ha presentado una mayor incidencia de erosión genética, pues se ha observado una considerable pérdida de especies nativas en el país. En el caso de la pérdida de los maíces criollos se debe al incremento de cultivos con variedades comerciales de mayor rendimiento, la introducción de modelos de producción de agricultura moderna, expansión de la frontera agrícola y la modificación en los sistemas de producción, factores que han deteriorado la producción local de alimentos y la soberanía alimentaria [4].

Entre las variedades criollas se encuentra el canguil, conocido internacionalmente como reventón, y sus derivados. Los especímenes típicos se encuentran a 2260 msnm, variedades de color amarillo, blanco, rojo o morado; mazorcas cortas, delgadas y cilíndricas con granos puntiagudos, plantas pequeñas y delgadas con hojas angostas en la base y con presencia de pequeñas aurículas, espigas erizadas de espículas densamente agrupadas [3].

Otra variedad de maíz criollo es la tusilla, cuyas especies típicas se encuentran desde 90 a 1500 msnm.; las cuales poseen mazorcas medianas de características flexibles, delgadas y cilíndricas, y con granos redondos duros de color

amarillo naranja. Estas plantas son fuertemente desarrolladas con hojas largas, delgadas y rígidas, mientras que sus tallos son delgados con nudos bien pronunciados [3].

En el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Caracterizar molecularmente las razas de canguil, tusilla y mezclas de maíz del Banco de Trabajo del Programa de Maíz del INIAP.

Objetivos Específicos:

- Determinar la variabilidad genética de las razas de canguil, tusilla y mezclas de maíz a través de 9 marcadores moleculares microsatélites.
- Analizar la diversidad genética existente del germoplasma en estudio, mediante herramientas bioinformáticas que determinen accesiones potenciales para futuros programas de fitomejoramiento.

La hipótesis de investigación a comprobar es que las variedades de canguil y tusilla no se diferencian a nivel genético de las mezclas de maíz.

II. DESARROLLO

Para la siembra de semillas de maíz en el invernadero, se utilizó 3 semillas por cada accesión, es decir se trabajó con 258 semillas, estas semillas se desinfectaron con Hipoclorito de Sodio al 5% y se lavaron 3 veces con agua destilada antes de sembrarlas.

La caracterización molecular se realizó en el laboratorio de biología molecular del Departamento Nacional de Biotecnología en la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.

En la extracción de ADN se empleó muestras vegetales (primordios foliares) de 15 días. El protocolo de extracción que se utilizó en esta investigación fue de Ferreira y Grattapaglia (1998) [5], finalmente se conservó el ADN a 4°C.

Para la validación se empleó los primers con marcadores moleculares tipo SSR, con los primer phi116 y phi121 de maíz disponibles en el Departamento Nacional de Biotecnología (Senior, 1998), se realizó el PCR en el termociclador PTC-100.

Para la amplificación de todas las muestras con los 9 primer se empleó el método M13-tailing los cuales fueron reportados por Morales (2003) y Nguyen et al., (2012), se utilizó el coctel de reacción PCR y se amplificó las muestras en el analizador LI-COR 4300, en gel de acrilamida. Antes de empezar a cargar se realizó una pre-corrída de 25 min a 1500 V para enfocar el focus del láser a 700 y 800 nm. Por último se cargó 0.8 µl de los productos amplificados los cuales fueron previamente diluidos con Blue Stop Solution LI-COR en una relación 1:1 y denaturados a 94 °C por 5 min, se inició la corrida a 1500 V por 1 hora y media. El marcador de peso molecular que se utilizó fue el IRDye 30-350 bp.

Con las muestras amplificadas seguidamente realizó el genotipaje de las muestras, para llevarlo a cabo se creó un proyecto en el software SAGA-GT Microsatellite llamado MAIZ, en este se detalló la información de cada primer como la talla, el canal en el que amplifican (700-800 nm), el rango del tamaño de bandas, los dúplex y triplex formados y se ubicó de antemano la posición que tuvo cada pocillo del gel con la muestra de maíz. Finalmente obtenidos los pesos de los alelos en pb se obtuvo la matriz genotípica y se la importó a los programas estadísticos: GenAlex6.5 [6], PowerMaker [7], NTSYS-pc [8], Infogen [9]. Los parámetros de diversidad determinados fueron:

- **Análisis de diversidad genética:** Número y tamaño de alelos, frecuencia alélica, número de genotipos, contenido de información polimórfica (PIC), heterocigosis observada (Ho) y esperada (He)
- **Estructura genética:** Análisis de agrupamiento, Análisis multivariado.
- **Diversidad genética por razas y mezclas de maíz:** Estadística F, distancia genética de Nei, AMOVA.
- **Estimaciones y medidas de confianza por re-muestreo:** bootstrap.

III. RESULTADOS

Análisis de diversidad genética

En la caracterización y agrupamiento de las razas de canguil, tusilla y mezclas de maíz pertenecientes al Programa de Maíz del INIAP con 9 primers SSR se observó un total de 72 alelos con un promedio de 8 alelos/locus.

Este trabajo fue apoyado por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC), bajo el auspicio de SENESCYT, PIC-12-INIAP-008 Convenio: 20120322.

En los trabajos de investigación en maíz realizados en el Ecuador por parte del Programa de Maíz del INIAP, se destaca el análisis de variedades de maíz de altura donde se obtuvo 74 alelos con un promedio de 8 alelos por SSR [10]. De igual manera en el estudio sobre Caracterización molecular de 27 accesiones de maíz chulpi (*Zea mays* L.) y 65 accesiones de maíz negro colectadas en la serranía del Ecuador, se obtuvo un total de 278 alelos con un promedio de 7 alelos por locus [11]. En el estudio realizado sobre Caracterización molecular de la colección núcleo de maíz (*Zea mays*) del banco de germoplasma del INIAP mediante 13 marcadores moleculares microsatélites en 136 accesiones, se obtuvo un total de 90 alelos con un promedio de 8 alelos/locus [12]. Los datos obtenidos en las investigaciones anteriores revelan que son similares al obtenido en el presente estudio, debido al uso de primers SSR polimórficos y al material genético similar empleado.

Los locus con mayor número de alelos obtenido en el presente estudio son phi033, phi053, phi034 y phi072, siendo mayormente polimórficos (por lo cual son óptimos para los análisis de diversidad genética). Mientras que, los locus phi083 y phi050 proyectaron menor polimorfismo (es decir mayor cantidad de alelos repetidos y de tamaños similares siendo poco informativos).

Las frecuencias alélicas oscilaron 0.0022 a 0.8531, observándose la mayor frecuencia alélica el locus phi50- 81 pb. Si la frecuencia de un alelo es muy alta, existe poca heterocigosidad [13]. En este estudio se observó que el alelo 81 tenía un alto grado de repetitividad; mientras que, 38 alelos (26,6%) pueden ser considerados como raros con frecuencias alélicas menores a 0.05.

La heterocigosidad observada (H_0) para los materiales en estudio fue de 0.4587; mientras que, la heterocigosidad esperada (H_e) fue de 0.6275. Los valores obtenidos indican que bajo la hipótesis de Hardy-Weinberg las accesiones en estudio no se encuentran en equilibrio. Esto debido a que el maíz es un cultivo anual anemófilo; considerado de fecundación predominantemente cruzada, factor que promueve la variabilidad genética existente en la población. Este proceso favorece a que determinados individuos se reproduzcan más que otros, generando que las frecuencias alélicas y genotípicas varíen alterando el equilibrio génico [14].

El valor del índice de polimorfismo contenido (PIC) osciló en un rango de 0.2443 y 0.7421, con un promedio de

0.58 para los 9 marcadores microsatélites utilizados, lo cual indica gran diversidad genética en las accesiones analizadas (Canguil, Tusilla y mezclas de maíz), pues poseen características particulares de cada zona de origen.

El maíz es una planta alógama (es decir que puede presentar polinización cruzada y fecundación entre individuos genéticamente diferentes); por lo cual presenta un alto grado de heterocigosis, generando plantas con un mejor rendimiento que los parentales [16] y [17]. En este estudio, al realizar la estructura genética de las especies de maíz se puede esperar que las variedades analizadas hayan sido obtenidas por autopolinización o por polinización cruzada. Al ser colectas realizadas por parte del Programa de Maíz del INIAP en diferentes provincias, el material vegetal para la conservación de la especie (semilla) depende de: la tasa de erosión genética diferencial, con cuellos de botella más severos o regímenes selectivos más estrictos para las poblaciones; debido a las preferencias de los agricultores y a condiciones ambientales adversas [13].

Estructura genética

De acuerdo al análisis de agrupamiento UPGMA detallado en la figura 1.1, existe relación entre las diferentes variedades de canguil (blanco, rojo y mixtura), pues se encuentran agrupadas en un mismo bloque. Además, en el análisis realizado se obtuvo que estas variedades posean relación con la población chulpi. Dicha población se encuentra ubicada principalmente en la Sierra ecuatoriana (provincias Chimborazo y Pichincha); al igual que las colectas de canguil obtenidas de las provincias de Carchi, Imbabura y Cotopaxi. En el caso de la variedad tusilla, no se encuentra agrupada uniformemente, debido a la polinización cruzada que pudieron haber sufrido los materiales en estudio (perdiendo de esta manera su estructura genética).

En el caso de las mezclas de maíz provenientes de colectas del austro y del Banco de Trabajo del Programa de Maíz, se observó la conformación de dos grupos; en los cuales, debido al flujo genético existe gran diversidad de genotipos en los individuos de investigación. Además, las poblaciones de maíz están sujetas a procesos de deriva, migración y a la selección (tanto natural como artificial) [13]. Por lo cual, es de gran importancia conocer cómo evoluciona este sistema; analizar la dinámica poblacional directamente en los campos de los cultivadores, y el impacto de sus prácticas en la determinación de la estructura y diversidad poblacional.

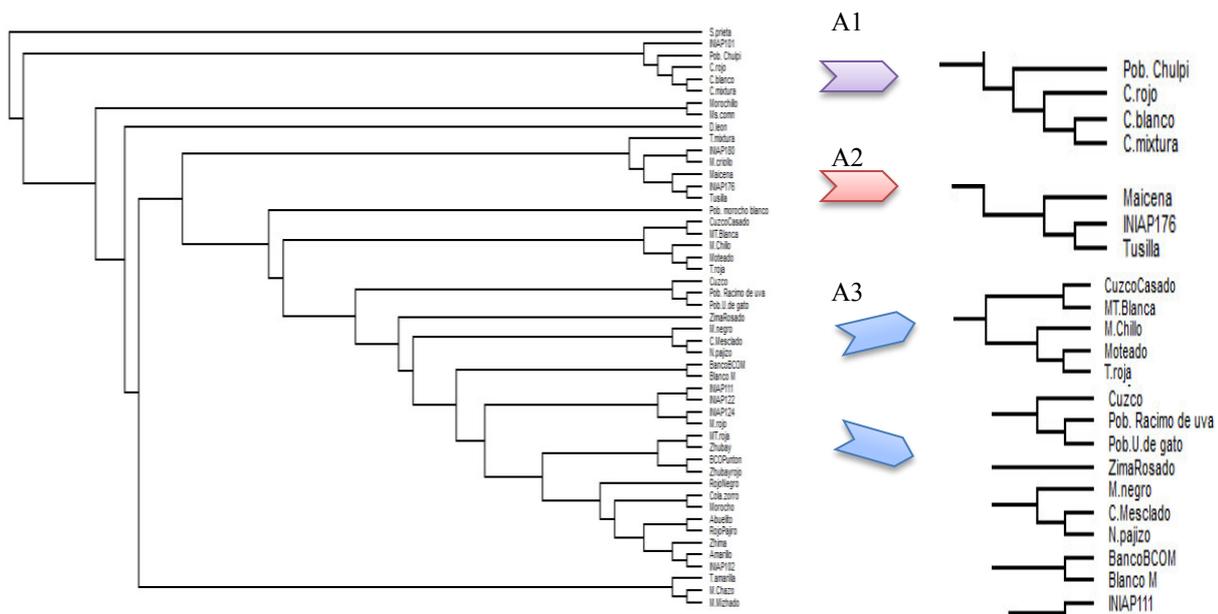


Figura 1.1: El dendrograma formado a partir de la matriz de distancia de Shared Allele Distance de las diferentes variedades de maíz obtenido del software PowerMarker (A1: población canguil, A2: tusilla, A3: mezclas de maíz en dos grupos)

En el análisis de coordenadas principales (PCO), se presentó una variabilidad acumulada de 21.62%. Debido a esto no hay formación de estructuras definidas. Sin embargo, se pueden distinguir la separación clara de las variedades de canguil (Canguil blanco proveniente de Cotopaxi) y algunas accesiones del austro, puesto que estos materiales provienen de zonas cercanas y no se han visto afectados significativamente por el flujo genico.

Los resultados obtenidos reflejan que existe variabilidad genética entre los genotipos estudiados, como se observa en la figura 1.2. La estimación de diversidad genética es importante en el proceso de mejoramiento vegetal [14]. Lo cual destaca que la presente investigación sea de base para estudios posteriores con la posibilidad de encontrar características interesantes que sean útiles para la formación de nuevas variedades en el Programa de Maíz del INIAP.

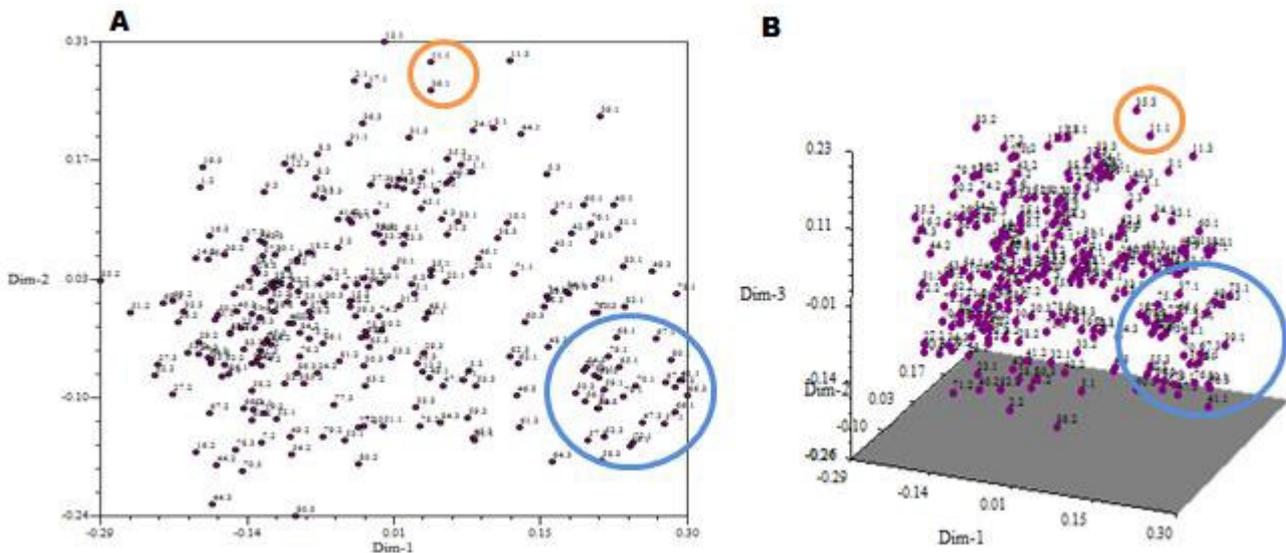


Figura 1.2: Análisis de coordenadas principales (PCO) de 258 muestras de maíz analizados con 9 primers SSRs, con A) dos coordenadas y B) tres dimensiones. Destaca las variedades canguil blanco (color naranja) y las mezclas de maíz (color azul)

Diversidad genética por razas y mezclas de maíz

En el análisis de diversidad genética de las razas de canguil y tusilla se realizó los estadísticos F, el análisis molecular de varianza y la distancia genética de Nei. Con respecto a los resultados del AMOVA indican que existe diferenciación genética, con un porcentaje del 7% entre variedades. Sin embargo, esta diferencia es mínima debido a que los materiales comparten similar información genética por la cercanía geográfica que poseen. Del total de la variación genética, los mayores porcentajes (61%) correspondieron a la variación dentro de cada individuo. Por lo cual los niveles de variación indican una diferenciación genética entre las variedades [18].

En cuanto a los estadísticos F, es la correlación entre genes homólogos tomados de un nivel de la subdivisión, en

El índice de fijación o F_{st} permite medir la reducción en la heterocigosis, debido a la diferenciación genética entre poblaciones [19]. El valor obtenido en este estudio fue de 0.29, siendo un valor cercano a 0 y nos indica que las frecuencias alélicas son iguales en todas las poblaciones; es decir que aún no ha habido diferenciación significativa. De los 9 loci analizados el valor más alto registrado fue por parte del locus $\phi 083$, con un valor 0.480. Esto indica que existe una alta fijación de cierto alelo para este locus, ya que mientras más se acerca a 1 más fijación de un alelo existe.

El locus con el menor valor de FIT es el $\phi 03$, siendo este 0.064; y el locus con menor valor de FIS es el $\phi 034$, siendo este 0.027. El mayor porcentaje de variación genética corresponde a los loci $\phi 083$, $\phi 050$, $\phi 059$.

El flujo genético obtenido en promedio fue de 0.660, siendo un valor menor a 1, se puede decir que la deriva génica actúa independientemente en cada una de las poblaciones Canguil y Tusilla [19].

En el estudio realizado por variedades con 13 loci, mostró un resultado positivo de Fis que indica un déficit de heterocigotos, con una media de 0.474; mientras que para dos loci fue negativo. Estos resultados indican un cierto grado de consanguinidad, que podría explicarse por el hecho de que los genotipos están relacionados genéticamente [15].

En la distancia de Nei entre las razas canguil (13 accesiones) y tusilla (21 accesiones), se observó que existe poca diferenciación genética entre accesiones de cada raza, con valores cercanos a 0, debido al parentesco genético. En cuanto a la diferenciación entre razas, se observó que existía diferenciación genética debido a que los valores de distancia fueron cercanos a 1. La mayor similitud observada en la

relación con cualquier otro nivel superior. En el caso del índice de estimación de endogamia Fis, permite describir la distribución de los genotipos dentro de una población. El resultado obtenido en este estudio fue de 0.005, siendo un valor cercano a 0 y nos indica que las frecuencias de genotipos en la población se obtendrían si los apareamientos fueran estrictamente al azar. Además el principal determinante de la endogamia en las poblaciones vegetales es la probabilidad de que una semilla sea el resultado de polinización cruzada; y al presentar un valor positivo señala un nivel de endogamia, pero como el valor es cercano a 0, se considera como baja en estas dos razas. De los 9 loci analizados, 4 de ellos presentaron valores negativos ($\phi 072$: -0.235, $\phi 031$: -0.280, $\phi 015$: -0.028, $\phi 053$: -0.131); lo que nos indica que en estos casos existe un exceso de heterocigotos, probablemente porque los individuos heterocigotos poseen mejores características y sobreviven mejor que los homocigotos (selección natural) [19].

matriz de distancia fue entre las variedades tusilla de Manabí con tusilla de Napo, las cuales tuvieron una distancia de 0.998. Mientras que, la mayor diferencia es entre las variedades tusilla de Orellana con tusilla de Sucumbios, con una distancia de Nei de 0.099.

En el análisis de la diversidad de las mezclas de maíz se consideró el análisis molecular de varianza, los estadísticos F y la distancia genética de Nei. En cuanto a los resultados del AMOVA indican que existe diferenciación genética, con un porcentaje del 4% entre variedades. Sin embargo, esta diferencia es mínima debido a que los materiales comparten similar información genética por la cercanía geográfica que poseen (Azuay y Cañar). Del total de la variación genética, los mayores porcentajes (66%) correspondieron a la variación dentro de cada individuo. Por lo cual los niveles de variación indican una diferenciación genética entre las variedades [18].

En los estadísticos F, el valor obtenido en el coeficiente de endogamia Fis fue de 0.018, siendo mayor al registrado en las variedades de Canguil y Tusilla debido al aumento en el número de variedades. El valor obtenido es cercano a 0 y nos indica que las frecuencias de genotipos en la población se obtendrían si los apareamientos fueran realizados estrictamente al azar. De los 9 loci analizados, presentaron valores negativos 4 de ellos ($\phi 072$: -0.305, $\phi 031$: -0.187, $\phi 033$: -0.228, $\phi 053$: -0.137), lo que nos indica que en estos casos existe un exceso de heterocigotos [19].

En este estudio se obtuvo que los loci: $\phi 072$, $\phi 031$, $\phi 033$, $\phi 053$, $\phi 015$ poseen un mayor número de homocigotos. El valor obtenido por el índice de fijación o F_{st} fue de 0.28 (siendo un valor cercano a 0) y nos indica que aún no ha habido diferenciación genética significativa [19]. De los 9 loci analizados, el valor más alto registrado

fue por parte del locus $\phi050$, con un valor 0.568 (indicando que existe una alta fijación de cierto alelo para este locus).

El locus con el menor valor de FIT es el $\phi071$, siendo este de -0.015; y el $\phi015$ con un FIS de 0.054. El mayor porcentaje de variación genética corresponde al locus $\phi050$, con un valor de 0.773.

El flujo genético obtenido en promedio fue de 0.756; este es un valor menor a 1, entonces se puede decir que la deriva génica actúa independientemente en cada una de las variedades [19].

En la distancia de Nei entre las mezclas de maíz (51 accesiones), se observó que existe diferenciación genética moderada entre accesiones, debido a que poseen una situación geográfica similar. La mayor similitud se observó para las variedades Sal prieta y Rojo Pajiro, con una distancia de 0.977. Mientras que, la mayor diferencia se observó entre las variedades Rojo Pajiro y Abuelito, con una distancia de Nei de 0.043.

Estimaciones y medidas de confianza por re-muestreo

Para la obtención de una muestra bootstrap, se realiza de manera aleatoria con reposición desde la muestra original. El error estándar y los intervalos de confianza fueron obtenidos mediante bootstrap entre cada loci; con un error estándar del 95% de significancia y con un número de 250 ciclos, respectivamente [9].

En los resultados obtenidos, se observó que el mayor porcentaje para la población Canguil en la estimación por Bootstrap fue de 75.6%, con un error estándar del 0.034 en el locus $\phi053$; en la población Tusilla la estimación fue de 74.1%, con un error estándar del 0.025 en el locus $\phi059$; en la población de mezclas de maíz fue de 79.3%, con un error estándar del 0.012 en el locus $\phi059$. Estos valores indican que el primer $\phi059$ fue el más polimórfico analizado en las poblaciones (dato que concuerda con el índice de información polimórfica 0.74).

Mientras que, en los resultados de menor valor para la población Canguil en la estimación por Bootstrap fue de 54.9%, con un error estándar del 0.065 en el locus $\phi050$; en la población Tusilla la estimación fue de 34.9%, con un error estándar del 0.067 en el locus $\phi050$. Finalmente, para la población de mezclas de maíz presento un porcentaje de 30.8%, con un error estándar del 0.046 con el locus $\phi050$.

Lo que indica que el primer $\phi050$ fue el menos polimórfico analizado en las poblaciones (dato que concuerda con el índice de información polimórfica 0.24).

IV. CONCLUSIONES

- Los marcadores moleculares SSR (simple sequence repeat) utilizados en el estudio, permitieron detectar los polimorfismos en las variedades de maíz de una forma fácil por medio de la técnica PCR y con una alta reproducibilidad. Debido a su codominancia y al alto grado de polimorfismo, estos microsatélites son apropiados para analizar la diversidad genética de maíz; con los cuales se pudo identificar la diversidad y la estructura genética del Banco de Trabajo del Programa de Maíz del INIAP.
- Existe una alta diversidad genética (0.63), sin embargo con el uso de los 9 marcadores microsatélites no se puede establecer grupos en base a su origen racial, debido a que es un número de primers relativamente pequeño para medir la variabilidad de 258 muestras de maíz.
- En el análisis de diversidad genética por razas de canguil y tusilla, el AMOVA dio un 7% de variabilidad genética. En los estadísticos F se observó un valor de diferenciación genética de 0.5% entre las razas. La mayor similitud en la distancia genética fue observada en las variedades tusilla de Manabí con tusilla de Napo.
- En el análisis de diversidad genética para las mezclas de maíz el AMOVA dio un 4% de variabilidad genética. En los estadísticos F se observó un valor de diferenciación genética de 1.8% entre las variedades. La mayor similitud en la distancia genética fue para las variedades Sal prieta y Rojo Pajiro.
- Con el análisis Bootstrap se obtuvo que el locus $\phi053$ es el más polimórfico en las poblaciones.
- En los resultados de la caracterización molecular se observa que las mejores accesiones potenciales para programas de fitomejoramiento en el caso de canguil es canguil balnco de Cotopaxi, en el caso de tusilla no se puede evidenciar una óptima accesión.

REFERENCIAS

- [1] C. Yáñez, Manual de producción de maíz para pequeños agricultores y agricultoras, Quito: FAO/INAMHI/MAG. p. 1-16, 2002.
- [2] INEC, «Visualizador de estadísticas agropecuarias del Ecuador ESPAC,» 24 Julio 2012. [En línea]. Available: http://www.inec.gob.ec/estadisticas/?option=com_content&view=article&id=103&Itemid=75.
- [3] M. Cárcamo, «Productores luchan por conservar el maíz criollo, amenazado de muerte por los transgénicos,» 7 Enero 2009. [En línea]. Available: http://webs.chasque.net/~rapaluy1/transgenicos/Uruguay/maiz_criollo.html.
- [4] L. Mera y C. Mapes, «Origen y diversificación del maíz,» de El maíz. Aspectos biológicos, C. Galindo, Ed., México, Impresora Apolo, 2009, pp. 17-19.
- [5] E. Morillo y G. Miño, «Manual Protocolos de Marcadores Moleculares,» INIAP, Estacion Experimental Santa Catalina, Departamento Nacional de Bio, Quito, Ecuador, 2011.
- [6] R. Peakall y P. Smouse, «GenAlEx 6.5: genetics analysis in Excel. Population genetic software for teaching an research-an update.,» Bioinformatics 28, 2537-2539., 2012.
- [7] K. Liu y S. Muse, «Power Maker: Integrated analysis environment for genetics marker.,» Consultado 10 de abr. 2013 2005. [En línea]. Available: <http://statgen.ncsu.edu/powermarker/>.
- [8] F. Rolph, NTSYS pc: numerical taxonomy and multivariate system, version 2.0, Setauket New York, USA.: Exeter Software, 1994.
- [9] M. Balzarín y J. Di Rienzo, «Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos.,» Facultad de Ciencia Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina, pp. 1-228, 2004.
- [10] K. Morales, EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR POR MICROSATÉLITES DE GENOTIPOS DE MAÍZ (*Zea mays* L.) DE ALTURA, INIAP., Quito, Ecuador: Universidad Central del Ecuador, 2003.
- [11] L. Jacho, «Caracterización molecular y análisis químico nutritivo de 27 accesiones de maíz chulpi (*Zea mays* L.) y 65 accesiones de maíz negro colectadas en la serranía del Ecuador INIAP,» Universidad Central del Ecuador, 2009.
- [12] A. Garrido, Caracterización molecular de la colección germoplasma del INIAP mediante marcadores moleculares microsateles., Quito, Ecuador, Escuela Politecnica del Ejercito. p78, 2010.
- [13] M. Galindo y P. Milagro, «GENETIC RELATIONSHIPS WITHIN AVOCADO (*Persea americana* Mill.) IN SEVEN MUNICIPALITIES OF CENTRAL VERACRUZ, CHARACTERIZED USING MICROSATELLITE MARKERS,» Tropical and Subtropical Agroecosystems, p. 4, 2011.
- [14] M. Bracco, V. Lia, L. Poggio, J. Hernández y A. Gottlieb, «Caracterización genética de razas de maíz autóctonas de Misiones, Argentina,» SCIELO, 2013.
- [15] A. Bravo, «Caracterización morfológica y molecular de accesiones de maíz negro (*Zea mays* L.) mediante Análisis de Secuencias Simples Repetidas,» Universidad San Francisco de Quito, 2009.
- [16] G. Acquaah, «Principles of Plant Genetics and Breeding,» Oxford: Blackwell Publishing., pp. 487-496, 2007.
- [17] D. Cerda, «Tropical Tree Improvement & Conservation in Nicaragua,» 28 Agosto 2011. [En línea]. Available: <http://cerdagrd.blogspot.com/2011/06/diversidad-genetica-definicion.html>.
- [18] J. Sánchez, «DIVERSIDAD DEL MAÍZ Y TEOCINTLE,» Informe preparado para el proyecto: “Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México”, 2011.
- [19] L. Eguarte, E. Aguirre, E. Scheinvar, A. González y V. Souza, Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas, Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México., 2010.