

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería
Departamento de Ciencias Agrícolas



Diversidad genética del germoplasma nativo de maíz (*Zea mays L.*) de las zonas secas de Guatemala

Trabajo de investigación presentado por
Marissa G. Lemus para optar el grado académico de
Licenciada en Ingeniería en Ciencias Agronómicas

**Guatemala
2005**

**Diversidad genética del germoplasma
nativo de maíz (*Zea mays L.*) de las zonas
secas de Guatemala**

UNIVERSIDAD DEL VALLE
DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

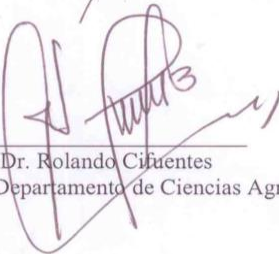
**Diversidad genética del germoplasma nativo de
maíz (*Zea mays L.*) de las zonas secas de
Guatemala**

Trabajo de investigación presentado por
Marissa G. Lemus para optar el grado académico de
Licenciada en Ingeniería en Ciencias Agronómicas

**Guatemala
2005**


Vo. Bo:


Dra. Silvana Maselli Sánchez
Asesor


Dr. Rolando Cifuentes
Director del Departamento de Ciencias Agrícolas

Tribunal:


Dra. Silvana Maselli Sánchez


Ing. Mario Fuentes


Dr. Rolando Cifuentes Velásquez

Fecha de aprobación:

23 de julio de 2005

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CONTENIDO	iv
LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xi
 Capítulos	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Los recursos fitogenéticos, su estudio e importancia en la alimentación mundial	3
2.1.1. Conservación y utilización de los recursos fitogenéticos	4
2.1.1.1. Recursos fitogenéticos como parte de la diversidad Biológica	6
2.2. Diversidad Genética	8
2.3. Recursos fitogenéticos en Guatemala	9
2.3.1. Guatemala, centro de origen y diversidad genética.....	12
2.4. El maíz como recurso fitogenético para la alimentación y la Agricultura	19
2.5. Problema de la sequía en Guatemala y su efecto en la producción de maíz	21
2.5.1. Tolerancia del maíz a condiciones de humedad limitada	23

2.6. Métodos de análisis y evaluación de la diversidad genética	26
2.6.1. Marcadores moleculares, herramientas para estudios de diversidad genética	27
2.6.1.1. Marcadores microsatélites (SSR –Simple Sequence Repeat)	29
III. OBJETIVOS	33
3.1. General	33
3.2. Específico	33
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	34
4.1 Colecta de material	34
4.2 Aislamiento de ADN	36
4.2.1. Protocolo de extracción	37
4.3. Cuantificación de Ácidos Nucléicos	39
4.3.1. Protocolo de cuantificación	39
4.4 Amplificación de ADN por PCR	40
4.1.1. Selección de primers	41
4.1.2. Protocolo de Amplificación.....	42
4.5. Carga de muestras, electroforesis, y condiciones de corrida	45
4.6. Tinción de los geles	47
4.7. Interpretación de las bandas en los geles y análisis estadístico de los resultados	47
V. RESULTADOS	49
5.1. Colecta del material	49

5.2. Aislamiento y cuantificación de ADN	49
5.3. Amplificación de ADN	49
5.4. Interpretación y análisis estadístico de los resultados	51
5.4.1. Análisis por microsatélites	51
5.4.2. Alelos característicos de las 21 colecciones	57
5.4.3. Índice de polimorfismo	58
5.4.4. Parámetros de diversidad genética	62
VI. DISCUSIÓN	66
6.1. Amplificación de ADN con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	66
6.2. Análisis de los microsatélites	66
6.3. Diversidad genética de la 21 colecciones	68
6.3.1. Índices de polimorfismo	68
6.3.2. Parámetros de diversidad genética	69
VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	72
VIII. BIBLIOGRAFÍA	74
VII. ANEXOS	80
Recetas de Soluciones Stock	83
Abreviaturas	85

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación de género Zea	13
2. Relación de razas del maíz en Guatemala	14
3. Distribución de maíz blanco en Guatemala	20
4. Distribución de maíz amarillo en Guatemala	21
5. Ventajas y desventajas de algunos métodos para medir variación genética	27
6. Lugar de procedencia del material vegetal colectado	35
7. Lista de primers o imprimadores seleccionados	43
8. Programa de amplificación	45
9. Tm utilizada por cada pareja de primers en el programa de amplificación	45
10. Individuos muestreados por colección	50
11. Colectas sometidas a PCR con Taq-polimerasa marca Sigma ...	51
12. Colectas sometidas a PCR con Taq-Polimerasa marca Mercury ...	51
13. Alelos tipo ampliamente distribuidos	58
14. Índices de polimorfismo obtenidos para las 21 colecciones estudiadas	58
15. Diversidad genética (He) y valores medios de heterocigosis para las colecciones 11 a 56	60
16. Diversidad genética (He) y valores medios de heterocigosis para las colecciones 63 a 77	60

17. Diversidad genética (He) y valores medios de heterocigosis para las colecciones 79 a 110	61
18. Parámetros de diversidad genética estudiados para 6 microsatélites en las colecciones 11 a la 56	62
19. Parámetros de diversidad genética estudiados para 6 microsatélites en las colecciones 63 a la 77	63
20. Parámetros de diversidad genética estudiados para 6 microsatélites en las colecciones 79 a la 110	64
21. Identidades genéticas para las 21 colecciones estudiadas	65
22. TE-8: 10mM tris/8.0, 1mM EDTA-pH 8.0	83
24. Buffer TG10X	83
25. Solución de colorante	83
25. Solución fijadora	84
26. Solución de tinción (AgNO ₃ (0.2%))	84
27. Solución de revelado 3% NaOH + 0.5ml/100ml formaldehído ...	84
28. Solución stopper (de inhibición de la reacción)	85

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Maíz comiteco y su distribución en Guatemala	15
2. Maíz Dzit-Bacal y su distribución en Guatemala	15
3. Maíz imbricado y grueso en Guatemala	16
4. Distribución del Nal-Tel en Guatemala	16
5. Distribución del maíz negro de Chimaltenango	16
6. Maíz Glotón y su distribución en Guatemala	17
7. Quicheño y su distribución en Guatemala	17
8. Distribución de la raza salpor en Guatemala	17
9. Serrano y su distribución en Guatemala	18
10. Tepecintle y su distribución en Guatemala	18
11. San Marceño y su distribución en Guatemala	18
12. Cultivos más importantes para el suministro de energía	19
13. Ejemplo de regiones microsátélites	30
14. Colecciones de maíz regeneradas en La máquina y Labor Cuyuta	34
15. Mapa, departamentos donde se colectó el germoplasma de maíz nativo.....	36
16. Material vegetal utilizando para el aislamiento de ADN	37
17. Material vegetal macerado	38
18. Equipo utilizado en la extracción	38
19. Locus phi029	44
20. Locus phi093	44

21. Locus phi024	44
22. Locus phi89	44
23. Locus phi034	44
24. Locus Umc1061	44
25. Carga de muestras en cámara de electroforesis vertical	46
26. Ejemplo de las bandas obtenidas en los geles	48
27. Marcador de peso molecular, mostrando las bandas y sus respectivos pesos moleculares	52
28a. Foto gel phi 093 correspondiente al alelo 281	53
28b. Foto gel phi 089 correspondientes a los alelos 281, 275, 271 ...	53
29a. Foto gel phi 024 alelos 173, 170, 168	54
29b. Foto gel phi 024 alelos 173, 172, 170	54
30a. Foto gel phi 034 alelos 137, 146, 143, 137, 122,118	55
30b Foto gel phi 034 alelos 137,136	55
31 Foto gel phi 029 alelos 137, 152, 150	55
32 Foto gel phi 089 alelos 95 y 87	56
33 Foto gel Umc 1061 alelos 110, 107, 104, 101, 98	57
34 (1) Mapa de isolíneas de anomalía de lluvias , mayo	80
35 (2) Mapa de isolíneas de anomalía de lluvias, junio	81
36 (3) Mapa de amenaza por sequía, República de Guatemala	82

RESUMEN

Los estudios de diversidad genética son cada vez más útiles para conservar y proteger al máximo los recursos naturales con que cuenta cada país. Esta tesis, que forma parte de un estudio más complejo dentro de la estrategia de conservación de Recursos Fitogenéticos del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas –ICTA-, presenta el primer estudio a nivel de ADN de la diversidad genética de germoplasma nativo de maíz de las zonas secas de Guatemala empleando marcadores moleculares microsatélites.

El estudio se realizó empleando 21 colecciones provenientes de los Departamentos de El progreso, Jalapa, Jutiapa, Zacapa, Chiquimula, Baja Verapaz y Huehuetenango, que luego de su caracterización agronómica demostraron ser tolerantes a condiciones de humedad limitada. El genoma de este material fue analizado a través de 6 marcadores moleculares, microsatélites (SSRs) distribuidos por cromosoma, que por medio de técnicas electroforéticas nos permitieron conocer parte de su estructura genética y evaluar la variabilidad presente entre dichas poblaciones a través de parámetros de diversidad genética e índices de polimorfismo.

La interpretación y el análisis estadístico de los resultados obtenidos muestran un alto índice de polimorfismo que nos indica que existe una alta diversidad genética que se encuentra distribuida en un 99.8% entre las poblaciones.

Lo anterior se pudo observar a través de un alto valor de la diversidad genética intrapoblacional obtenido H_s 0.41 *versus* un bajo valor de la diversidad genética interpoblacional D_{st} = 0.12.

Este estudio permitió de igual manera conocer qué materiales son potenciales para estudios posteriores así como identificar los microsatélites que presentan mejores resultados con el material nativo de Guatemala.

I. INTRODUCCIÓN

Los recursos fitogenéticos han sido reconocidos como recursos de importancia estratégica para la humanidad, para muchos son la base de la sobrevivencia humana.

Cada país es responsable por la conservación y utilización sostenible de la diversidad de los recursos genéticos que posee y Guatemala, aun siendo un país pequeño, cuenta con una gran diversidad biológica, gracias a su posición estratégica y a la amplia gama de microclimas que posee.

Los estudios de diversidad genética constituyen una valiosa herramienta en la estrategia de planificación para la conservación de las especies y de los recursos fitogenéticos nativos del país.

Esta tesis forma parte de un estudio más amplio dentro de la estrategia de conservación de recursos fitogenéticos de Guatemala que lleva a cabo el ICTA a través del Programa de Mejoramiento de Maíz, Programa de Recursos Naturales Renovables y la Unidad de Apoyo del Banco de Germoplasma. La estrategia cubre actividades de colecta, evaluación, conservación, caracterización agronómica y molecular de germoplasma nativo de Guatemala, incluyendo al maíz y sus parientes silvestres. Es dentro de esta estrategia que se está desarrollando actualmente el proyecto AGROCYT No. 10-02 titulado “Colección, evaluación, caracterización agronómica y molecular con microsatélites (SSR) de germoplasma de maíz (*Zea mays* L.) con tolerancia a sequía. Este trabajo de tesis forma parte importante del proyecto global.

Las actividades que se desarrollan dentro de la estrategia de conservación forman parte de las actividades básicas recomendadas por el Plan de Acción Mundial para la conservación de los Recursos Fitogenéticos, presentado por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para La Agricultura y la Alimentación), en 1996.

Esta tesis presenta el primer estudio realizado sobre diversidad genética de germoplasma nativo de maíz proveniente de las zonas secas de Guatemala (El Progreso, Jutiapa, Jalapa, Zacapa, Chiquimula, Baja Verapaz y Huehuetenango). Empleando seis marcadores moleculares microsatélites (SSR) se generó información básica sobre la diversidad genética de 21 colecciones, que previa evaluación en campo realizada para

conocer su respuesta a diferentes ambientes con condiciones de humedad limitada probaron ser tolerantes a sequía.

Los índices de polimorfismo y parámetros de diversidad genética empleados para determinar la diversidad genética presente en las 21 colecciones, indican que su diversidad genética total es alta y contenida en un 78% dentro de las colecciones. Los resultados indicaron, con los seis marcadores microsatélites (SSR) empleados para el estudio, una distribución homogénea de los alelos en los siete Departamentos de las zonas secas de Guatemala.

Los resultados de esta tesis contribuirán a conservar los recursos fitogenéticos de maíz de Guatemala, ampliar su base genética y a complementar la información necesaria para generar variedades de maíz tolerantes a sequía.

II. Marco Teórico

2.1 Los recursos fitogenéticos, su estudio e importancia en la alimentación Mundial.

El suelo, el agua, y los recursos fitogenéticos (RFG) constituyen el fundamento en el que se basa la agricultura y la seguridad alimentaria mundial (FAO 1996^a:10), sin embargo de estos tres elementos el menos conocido y menos valorado es el de los recursos fitogenéticos.

Los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura, RFAA, están formados por la diversidad del material genético que contienen las variedades tradicionales y los cultivares modernos, así como la plantas silvestres, que pueden ser utilizadas para alimentación, fibras, madera, energía etc. Según el informe sobre el estado de los recursos fitogenéticos en el mundo, preparado para la conferencia Técnica Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos en Leipzig, Alemania 1996, este término encierra la implicación de que el material tiene o puede tener un valor económico utilitario.

A lo largo de la historia, los recursos, no sólo, han contribuido a la estabilidad de los agroecosistemas, sino también, han proporcionado materia prima fundamental para el surgir del fitomejoramiento científico moderno. Ahora siguen constituyendo la base de la evolución de los cultivos, como recurso natural que permite la adaptación a una infinidad de medios. Los recursos provenientes de materiales nativos, particularmente resistentes a plagas, enfermedades y a factores bióticos, constituyen recursos de incalculable valor por su potencial utilización en la mejora de las plantas cultivadas que sostienen a la humanidad. El potencial de los RFG para el uso productivo constituye el principal motivo para la conservación de germoplasma y asimismo, atribuye a los recursos genéticos su valor como materia prima (FAO, 1996^a:10).

La importancia e interés de la conservación de los recursos fitogenéticos quedó patente a partir de la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo, realizada en Río de Janeiro (1992), estableciendo entonces que la conservación y utilización de los recursos fitogenéticos son fundamentales para mejorar

la productividad y la sostenibilidad de la agricultura, contribuyendo así al desarrollo nacional, la seguridad alimentaria y el alivio de la pobreza (Aranguren *et al.* 2003).

Según el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE 2004, el valor de los RFG no solamente depende de sus características intrínsecas, también está relacionado al valor del producto como resultado de su uso y de la contribución que sin duda ellos proporcionan a los procesos de producción.

Ningún país es autosuficiente en materia de RFG. La interdependencia de los países en el acceso de los RFG sugiere, según el CATIE (2004), que la diversidad citogenética es un recurso de importancia internacional, y, por eso debería ser considerado no sólo como una prioridad nacional, sino como una responsabilidad global.

2.1.1 Conservación y utilización sostenible de los recursos

fitogenéticos. La conservación de los recursos fitogenéticos se basa en preservar y mantener la diversidad genética de las plantas (Frankel 1975). La estrategia de su conservación dependerá de la naturaleza del material y del objetivo de la conservación.

En 1974 se creó el Centro Internacional para los Recursos Fitogenéticos (IBPGR, ahora IPGRI), con la función principal de desarrollar y administrar la red de trabajo de conservación de los recursos fitogenéticos a nivel internacional, a través de la promoción, colección, conservación y evaluación de los recursos fitogenéticos de las especies de mayor importancia económica y de sus especies silvestres (Ford-Lloyd 1986:24).

En 1975 a través de la Conferencia para el Medio Ambiente de las Naciones Unidas (PNUMA), contando con la FAO y el Programa Internacional de Biología (IBP), el problema de los Recursos Fitogenéticos tomó un interés mundial. Se hace entonces la recomendación a los Gobiernos y Agencias de las Naciones Unidas a preservar los recursos genéticos irremplazables, para beneficiar tanto a generaciones presentes como futuras.

Para 1996 y como consecuencia del primer informe presentado por la FAO sobre el estado de los recursos fitogenéticos en el mundo, surge el Plan de Acción

Mundial para la Conservación de los recursos fitogenéticos. El plan de acción mundial presenta un conjunto de recomendaciones y actividades para la conservación y utilización sostenible de los recursos fitogenéticos. Este plan se adoptó formalmente el 23 de junio de 1996, confirmando la participación de los gobiernos en la implementación del plan dentro del contexto de políticas nacionales para fortalecer la seguridad alimentaria mundial.

El Plan de Acción Mundial presenta una contribución fundamental para la implementación exitosa de la conservación sobre la diversidad biológica, teniendo como principales objetivos:

- Asegurar la conservación de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura como base de la seguridad alimentaria.
- Promover una utilización sostenible de los recursos fitogenéticos a fin de fomentar el desarrollo y reducir el hambre y la pobreza (FAO 1996c:64).

El Plan de Acción Mundial para la Conservación de los Recursos Fitogenéticos contiene 20 actividades prioritarias agrupadas en cuatro áreas temáticas:

- Conservación y mejoramiento *in situ*
- Conservación *ex situ*.
- Utilización de los recursos fitogenéticos
- Instituciones y creación de capacidad (FAO 1996c:64)

Como actividad inicial en el área de Conservación y Mejoramiento se encuentra el estudio e inventario de la diversidad genética, que comprende la conservación racional y programas nacionales para la utilización de los recursos fitogenéticos. El estudio de los recursos fitogenéticos existentes, el desarrollo de nuevos métodos para evaluar la diversidad genética, la ampliación de base de datos y el aumento de la potencialización genética, son los principales objetivos en la realización de estudios e inventarios de la diversidad genética, objetivos que conducirán a una ampliación de la

base genética de los cultivos para la alimentación y el incremento de la seguridad alimentaria mundial.

A partir de la adopción del plan en la conferencia de Leipzig, tanto los países como las instituciones y organizaciones interesadas en los recursos fitogenéticos han comenzado a utilizar sus propios recursos con la capacidad existente para implementar el plan, sin embargo, la documentación de una gran parte de los recursos fitogenéticos de todo el mundo es insuficiente y deficiente. En numerosos países simplemente no hay información sobre las propias colecciones.

Existe una enorme reserva de riqueza intacta y desaprovechada. Sin embargo actualmente existen varios métodos y mecanismos científicos y tecnológicos utilizados para la conservación y utilización de los recursos fitogenéticos. Los avances en la biología molecular permiten cada vez más poner estos recursos a trabajar de maneras poderosas para mejorar los cultivos de la población pobre de los países en desarrollo. Este tema se abordará de manera más amplia en una sección más adelante.

2.1.1.1 Recursos fitogenéticos como parte de la diversidad biológica. Diversidad biológica es la variedad de y la variabilidad entre organismos y el complejo ecológico del cual son parte (Castañeda *et al.* 2001). Esta gran variedad de formas de vida en equilibrio nos ofrece múltiples beneficios como alimento, vivienda y medicina que garantizan nuestra supervivencia en el planeta.

La diversidad de especies de plantas ha venido evolucionando de una forma natural hasta hace unos años, sin embargo la presión humana sobre estos y otros ecosistemas naturales están dando como resultado la pérdida de esta diversidad.

Para los fines de este estudio la biodiversidad que nos interesa es la *agrobiodiversidad*, que es simplemente aquella parte de la diversidad biológica relevante para la agricultura y la alimentación que resulta de la interacción entre el ambiente, los recursos genéticos y los sistemas y prácticas de manejo utilizadas por agricultores.

Esta agrobiodiversidad tiene particular importancia ya que contribuye fundamentalmente al desarrollo sostenible (IPGRI 2004:20). Ya sea por razones

culturales o por el simple hecho de representar un aporte seguro de alimento la mayoría de nosotros nos beneficiamos de esta diversidad.

«...la agrobiodiversidad es el fundamento para mejorar los sistemas de producción agrícola, creemos que la población humana necesita mejores sistemas agrícolas para salir del hambre y la pobreza y construir un futuro sostenible. (Baena *et al.* 2004:130)

La diversidad es un tema que actualmente se está discutiendo en muchos foros nacionales. La pérdida de especies, tanto animales como vegetales, producto de la deforestación, prácticas y tecnologías agrícolas no apropiadas, el urbanismo etc., ha motivado a muchas organizaciones a solicitar el resguardo de aquellas áreas que son ricas en diversidad de vida, planteando la necesidad de conservar los recursos biológicos para poder enfrentar cambios y suprimir necesidades en el futuro. Estos recursos conservados nos permitirán mejorar cultivos, así como recuperar ambientes deteriorados permitiendo asegurar suficiente alimento para una población en continuo crecimiento.

Desafortunadamente, la importancia de la agrobiodiversidad y de la conservación de los recursos fitogenéticos no está del todo comprendida, incluso entre muchos científicos (IPGRI 2004).

Guatemala forma parte contratante en El Convenio sobre la Diversidad Biológica, que tiene como objetivo cubrir el vacío existente a nivel internacional en el campo de la biodiversidad. En su artículo 6 expresa que «Cada parte Contratante (.....) elaborará estrategias, planes o programas nacionales para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica». Este convenio obliga a que cada uno de los firmantes apruebe y desarrolle una estrategia nacional para la biodiversidad. A pesar de que la estrategia guatemalteca lleva casi seis años discutiéndose, no se ha llegado a resultados sustanciales hasta el momento (Castañeda, *et al.* 2001).

2.2 Diversidad genética.

La biodiversidad puede dividirse en tres categorías jerarquizadas: los genes, *Diversidad Genética*; las especies, *Diversidad Específica*, y los ecosistemas, *Diversidad Ecológica*, que describen muy diferentes aspectos de los sistemas vivientes y que los científicos miden de diferentes maneras.

Por diversidad genética se entiende la variación de los genes dentro de las especies. A nivel de una sola especie, puede existir mucha o poca variabilidad genética, dada por la cantidad de *alelos* diferentes que tenga la especie (variabilidad genotípica), y los caracteres que estos diferentes alelos codifiquen en el organismo (variabilidad fenotípica) (Maselli 1997:43). La diversidad genética, conocida también como variación, es un componente muy importante en los estudios de la biodiversidad.

Los diversos genotipos son consecuencia de variaciones en las cadenas de nucleótidos que constituyen el material genético. Cuando estas variaciones causan cambios en las estructuras de las proteínas que sintetizan, las distintas conformaciones génicas responsables de esa variación constituyen la variación alélica que puede tener lugar en diversos sitios de los distintos cromosomas del genoma vegetal, generando loci genéticamente polimórficos (Maselli 1997:43).

El deterioro y fragmentación de los hábitats, el cambio climático, la introducción de especies foráneas, la explotación excesiva de cultivos y la tecnificación de la agricultura, entre otros, son principales causas de lo que se conoce como *erosión genética*, o pérdida de diversidad. Esta pérdida de diversidad genética, pone en peligro nuestra calidad de vida y la subsistencia de las generaciones venideras.

La erosión genética trae consigo el riesgo de hambruna para la población (Castañeda *et al.* 2001), especialmente cuando ocurre en cultivos de importancia alimentaria como son el trigo, el arroz y el maíz.

La variabilidad genética, como recurso natural de las poblaciones nativas de plantas, debe conservarse, ya que constituye para la propia especie un recurso de supervivencia y de futura evolución, bajo ambientes cambiantes y a la vez, constituye un recurso potencial para mejorar la productividad de otras poblaciones o especies.

Las consideraciones y toma de conciencia a que dio lugar el descubrimiento de la pérdida de la variabilidad genética, han puesto de manifiesto la importancia de los

genes contenidos en las plantas nativas y silvestres, reconociendo esta variabilidad como un recurso fitogenético.

Estudios realizados por Vavilov en 1926 demuestran que la variación genética de las especies cultivadas se encuentra concentrada en ciertas regiones del mundo a las que nombró centros de origen.

Altieri, 2003 menciona en su artículo preparado para El Secretariado de la Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte, que la presencia de la diversidad genética sobre todo en los centros de origen es de fundamental importancia para conservar y mejorar la productividad de los cultivos agrícolas en los países en desarrollo caracterizados por agroclimas variados y ambientes heterogéneos.

En resumen se puede decir que la importancia e interés del estudio y la conservación de la diversidad vegetal se puede dividir en cuatro aspectos: el primero de ellos de orden genético productivo, ya que la diversidad es necesaria para mantener la variabilidad de las poblaciones, la cual permite la adaptación a diferentes ambientes, algunas veces adversos. El segundo es de carácter científico, ya que, el estudio de cada especie vegetal en particular puede ser de interés para detectar posibles genes únicos y valiosos, en el momento, actual o futuro, en estas poblaciones; el tercero de orden histórico-cultural, dado que la conservación de determinadas especies presentan patrimonio genético de un país; y el cuarto de índole ecológico-ambiental, ya que los ecosistemas son el resultado del equilibrio entre clima, flora y fauna y cualquier factor que afectara a alguno de estos componentes estaría atentando contra ese equilibrio, deteriorando el medio (Aranguren *et al.* 2003).

2.3 Recursos fitogenéticos en Guatemala. Guatemala es un país ubicado en la región subtropical del hemisferio norte con un relieve marcadamente montañoso en casi el 60 % de su superficie. Las diferentes zonas ecológicas varían desde el nivel del mar hasta aproximadamente 4,000 metros de altitud, con precipitación pluvial que varía de una zona a otra desde los 400 hasta aproximadamente 4000 mm. anuales.

La variabilidad del país en diferentes pisos altitudinales conduce a la variabilidad de climas, fisiografía y suelos, los cuales constituyen factores importantes en la diversidad de habitats y ecosistemas y por ello en el tipo y variación de vegetación y

fauna; ello, explica la diversidad de cultivos que pueden producirse y las diferentes formas biológicas susceptibles de ser aprovechadas (Castañeda *et al.* 2001).

La gran diversidad ecosistemática en un espacio relativamente pequeño es la base fundamental de la alta biodiversidad del país y como mencionan Castañeda *et al.* en la primera parte de su documento, *La importancia de la biodiversidad en el desarrollo de la sociedad guatemalteca*, presentado en el Foro II, Xelajú 2001.

« Guatemala forma parte de uno de los 12 megacentros de plantas cultivadas del mundo, (sur de México y América Central), en el cual se originó el maíz (*Zea mays*), frijol común (*Phaseolus vulgaris*), frijol piloy (*Phaseolus coccineus*), y otras especies cultivadas.»

Aunque se reconoce que Guatemala cuenta con una alta diversidad biológica y cultural, como producto de los dinámicos procesos naturales y sociales, esta diversidad no se conoce apropiadamente y mucho menos se maneja al servicio de la sociedad en general. (Castañeda *et al.* 2001) Sin embargo por su condición de centro de origen y diversidad de plantas cultivadas y en general región de alta diversidad vegetal, Guatemala, representa un área de interés para los países desarrollados en función de conservación de nuestra diversidad (Azurdia 1999:89).

Lo anteriormente expuesto nos lleva a concluir que para Guatemala es importante mantener bien establecida la situación nacional así como el marco internacional en lo relativo a la conservación de los recursos fitogenéticos. Para ello se ha desarrollado en los últimos años la Estrategia Nacional para la Conservación y el Uso Sostenible de la Biodiversidad, que tiene como finalidad lograr el uso sostenible y la conservación de la biodiversidad existente en nuestro país de forma que contribuya al bienestar y desarrollo de los guatemaltecos.

Esta Estrategia surge como consecuencia del Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), del que Guatemala es parte contratante. Convenio que nos responsabiliza como país a realizar las acciones necesarias para la conservación y protección de la biodiversidad.

Guatemala, sin embargo, ha reportado dificultad en el cumplimiento de las actividades relacionadas con la conservación y la protección de los RFG debido a

problemas relacionados principalmente al acceso de los recursos genéticos y a la tecnología (biotecnología).

Algunas instituciones entre las que se pueden mencionar la Facultad de Agronomía de la Universidad San Carlos y el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) han iniciado proyectos en dicho campo y como resultado de dichos proyectos actualmente se cuenta con inventarios de Recursos Genéticos nativos que en algunos casos se complementan con sus caracterizaciones morfológicas, nutricionales y económicas (Azurdía, 1999:89).

Dentro del marco de la Estrategia Nacional de Biodiversidad y el Plan de Acción para la Conservación y Uso Sostenible de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y Agricultura de la FAO (1996), se inserta a nivel nacional el Programa de Recursos Naturales y el Banco de Germoplasma del ICTA.

El Programa de Recursos Naturales y el Banco de Germoplasma del ICTA han tenido una participación directa a nivel nacional e internacional en la conservación de los recursos fitogenéticos. Esto se ha logrado a través del desarrollo de actividades y proyectos de investigación en rescate, colecta, regeneración y conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos y de las colecciones de la institución.

Actualmente dentro del Banco de Germoplasma se desarrolla el proyecto de integración de la conservación del germoplasma del ICTA con los programas de Mejoramiento. Los objetivos de este proyecto son: conservar el germoplasma de importancia económica, alimenticia y medicinal en óptimas condiciones de almacenamiento y potenciar, optimizar y ampliar las actividades de prospección, recolección, análisis y caracterización de los recursos fitogenéticos de Guatemala.

También se están desarrollando otros proyectos de conservación y caracterización bioquímica con chile habanero (*Capsicum chinense*) y de caracterización molecular con maíz (*Zea mays L.*)

Este estudio de diversidad genética forma parte esencial del proyecto: **Colección, evaluación, caracterización agronómica y molecular con microsatélites (SSR) de germoplasma de maíz (*Zea mays L.*) con tolerancia a sequía.**

Es importante mencionar que toda línea en el campo de estudio de la agrobiodiversidad, debe llevar no sólo a realizar diagnósticos al que se le agregan

planes, sino que esta conservación debe integrarse con la utilización sostenible de la diversidad biológica en los planes, programas y políticas sectoriales.

2.3.1 Guatemala centro de origen y diversidad de maíz. Para cada

cultivo existe uno o más centros de origen en donde se domesticó. Este suele ser el centro primario de diversidad *in situ* para ese cultivo, y el constante flujo de genes entre los cultivos y los parientes silvestres afines en dichas zonas ponen en relieve su importancia como fuente de nueva variabilidad.

Como se mencionó previamente la presencia de la diversidad genética, sobre todo en los centros de origen, ha sido de fundamental importancia para conservar y mejorar la productividad de los cultivos agrícolas.

Según La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, (2003), la interacción riqueza – humana- riqueza botánica existente; hace del país un lugar que permite estudiar la diversidad genética y evolución de plantas cultivadas, tanto del maíz como de otros cultivos de importancia.

En el maíz (*Zea mays* L.), especie vegetal de origen mesoamericano, suele encontrarse alta diversidad. En una población de maíz, si la observamos detenidamente, no existen dos plantas iguales; el color de los granos en la mazorca son vivos ejemplos de la diversidad de genotipos (individuos que comparten un conjunto de características distintivas, heredables del resto de su misma especie) presentes en nuestro país (Aguilar 2002).

Muy relacionada con el origen de una especie cultivada está también su diversidad. La región comprendida entre México y Guatemala es reconocida como Centro de Origen y es reportada como la región que posee la mayor diversidad de maíz a nivel mundial. Esta diversidad se expresa en la diversidad de colores, formas y tamaños de granos, mazorcas, etc. En muchas regiones de Guatemala, aún se conservan cultivares primitivos, que se han cultivado desde hace cientos de años y cuyo germoplasma se traslada de generación en generación. Esta diversidad genética del germoplasma, representa un escalón para el mejoramiento genético y para la conservación, es por esto, que se considera de gran valor. A continuación se presentan una clasificación básica del género *Zea* (cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación del género *Zea*

Clasificación del género <i>Zea</i>	
Género <i>Zea</i>	
Sección LUXURIANTES	
	<i>Zea diploperennis</i> (perennial teosintle)
	<i>Zea luxurians</i>
	<i>Zea perennis</i>
Sección ZEA	
	<i>Zea mays</i> (corn)
	<i>Zea mays mays</i> (maize)
	<i>Zea mays mexicana</i> (teosintle)
	Race Nobogame
	Race Central Plateau
	Race Chalco
	<i>Zea mays parviglumis</i>
	var. <i>parviglumis</i> (=race Balsas)
	var. <i>huehuetenangensis</i> (race Huehuetenango)

(Fuente: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, Cimmyt 2001:57)

Basados en la morfología de las brácteas de las espigas masculinas, se propuso un nuevo sistema de clasificación del género *Zea*. Primero, *Zea* fue separado en dos secciones: Luxuriantes y *Zea*. La sección Luxuriantes se agrupa en tres especies: *Z. luxurians*, *Z. diploperennis* y *Z. perennis*.

La sección *Zea* compone solamente una especie, *Z. mays*, que a su vez se subdivide en tres subespecies; ssp *mays* para el maíz, ssp *mexicana* para la raza Nobogame, Central Plateau y Chalco y ssp *parviglumis*, la cual se separa en dos variedades, var. *parviglumis* para la raza Balsas y var *Huehuetenanguensis* para la raza Huehuetenango. Posteriormente en Doble (1984, 1990) se sugiere que la var. *Huehuetenanguensis* debe ser elevado al nivel de subespecie (Cimmyt 2001).

Con respecto a la separación del género en las secciones Luxuriantes y *Zea* no existe ninguna controversia debido a que existen evidencias morfológicas, isoenzimáticas, ADN organelo citoplásmicas, y citológicas que la respaldan (Cimmyt 2001).

La principal controversia reside dentro del género *Zea*, particularmente en el agrupamiento del teosintle anual y el maíz en una misma especie, *Z. mays*. Existen

evidencias basadas en información cromosómica y datos morfológico-ecológicos que muestran que el teosinte anual y el maíz están completamente aislados uno del otro. Aunque la información izoenzimática muestra un nivel menor de introgresión entre poblaciones de estos dos tipos de plantas, tienen prácticamente los mismos alelos isoenzimáticos y la frecuencia de éstos son distintos entre la mayoría de las razas de teosinte y la mayoría de las razas del maíz.).

Cuadro 2. Relación de razas del maíz en Guatemala

Salpor		Salpor tardío
Serrano		San Marceño
	Negro tierra fría	
	Imbricado	
Quicheño	Olotón	Nal-Tel de tierra alta
		Negro de Chimaltenango
	Comiteco	
Tuxpeño		Tepecintle
Nal-Tel de tierra baja		
Negro de tierra caliente		
Dzit-Bacal (Guatemala)		

(Fuente: Cimmyt 2001:57)

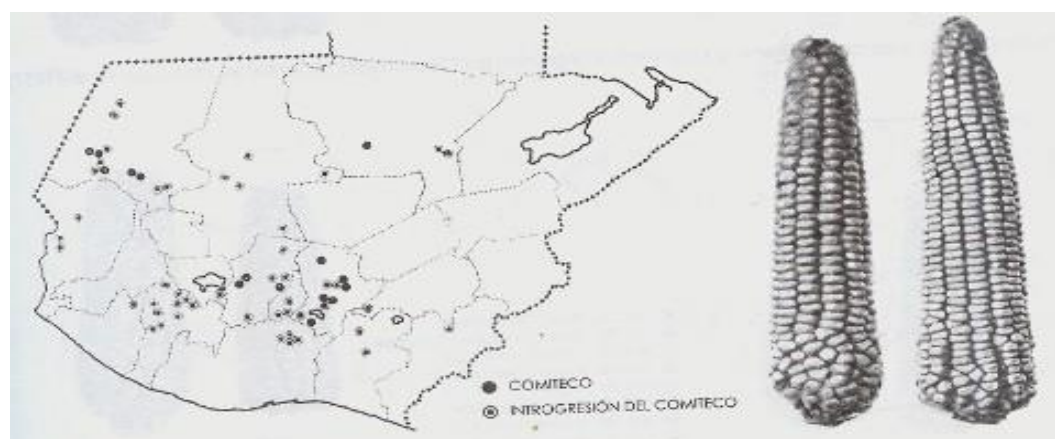
De acuerdo con Wellhausen *et al.*, (1957), *apud* Azurdia, 2004 existen 13 razas distintas y nueve sub-razas, en las que se incluyen dos razas antiguas de maíz palomero o reventón, cuatro razas que fueron introducidas a Guatemala en épocas prehistóricas, y siete razas que se cree que se han originado a través de hibridaciones entre razas primitivas y de hibridación de maíz y teosinte.

Entre las razas primitivas se tiene a Nal-Tel, con las sub-razas amarillo tierra baja, blanco tierra baja, amarillo tierra alta, blanco tierra alta y ocho razas imbricado sin ninguna sub-raza. Las razas exóticas y derivadas están constituidas por la raza Serrano; San Marceño; Quicheño, con dos sub-razas, rojo y ramoso; raza negra de Chimaltenango, con las subrazas negro de tierra fría y negro de tierra caliente; raza Salpor; raza Salpor tardío; Olotón, Comiteco; Dzit Bacal; Tepecintle y raza Tuxpeño.

La riqueza genética anotada es considerable si comparamos el número de razas de maíz presentes en México (25 razas según Wellhausen *et al.* 1952 *apud* Azurdia 2004), considerando el área cubierta por dicho país en relación al área cubierta por Guatemala. Por otro lado, para América Central se reportan 14 razas, 13 de las cuales están localizadas en Guatemala. Estos resultados han llevado a plantear a Guatemala como centro de convergencia y divergencia de razas de maíz, especialmente el área occidental del país.

Se debe tomar en cuenta que el maíz tiene polinización abierta, por lo cual existen materiales genéticos que resultan de la introgresión de algunas de las razas anotadas, lo cual contribuye a aumentar la diversidad genética del país (Azurdia 2004:89). Las Figuras de la 1 a la 11 muestran la distribución de algunas de las razas de maíz.

Figura 1. Maíz comiteco y su distribución en Guatemala



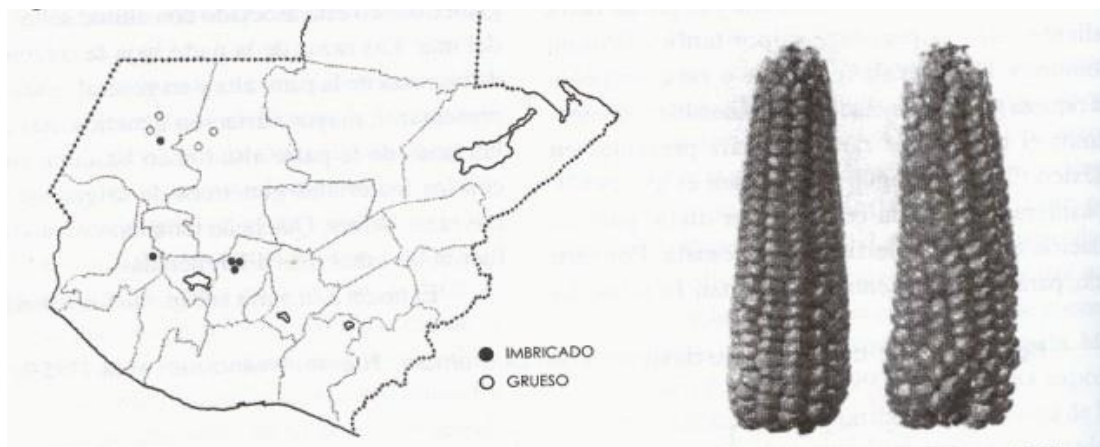
(Fuente: Azurdia 2004 :105-108)

Figura 2. Maíz Dzit-Bacal y su Distribución en Guatemala



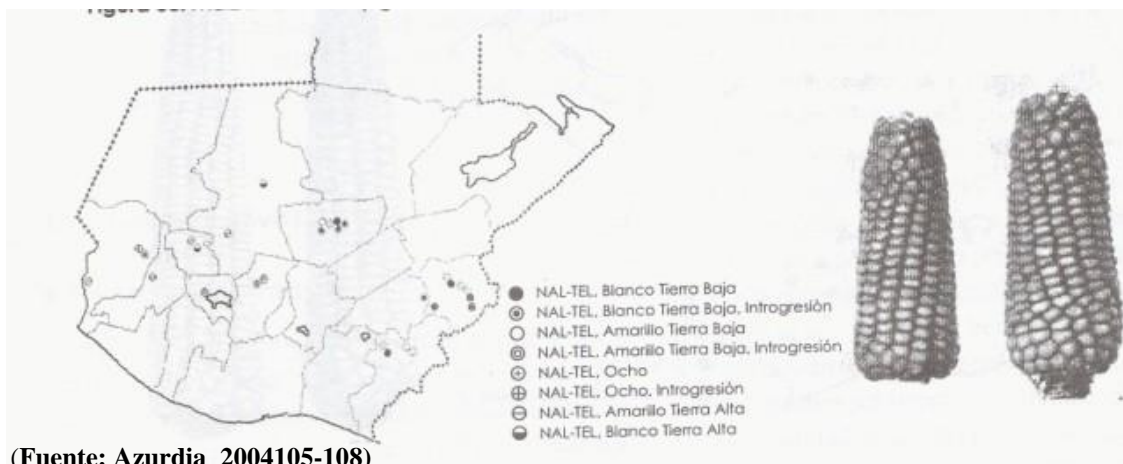
Fuente: Azurdia 2004105-108)

Figura 3. Maíz Imbricado (figura a la derecha) y grueso en Guatemala.



(Fuente: Azurdia 2004105-108)

Figura 4. Distribución de Nal-Tel en Guatemala



(Fuente: Azurdia 2004105-108)

Figura 5. Distribución de maíz Negro de Chimaltenango.



(Fuente: Azurdia 2004105-108)

Figura 6. Maíz Olotón y su distribución en Guatemala

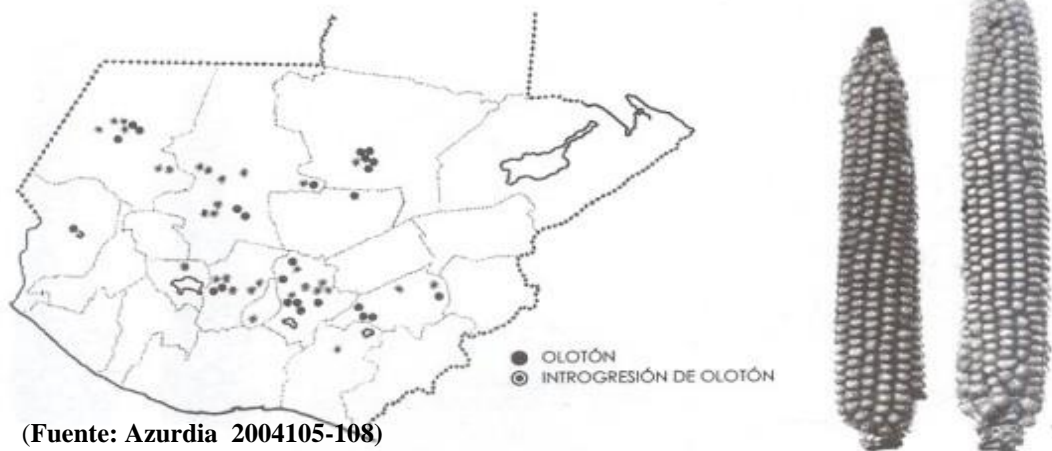


Figura 7. Quicheño y su distribución en Guatemala



Figura 8. Distribución de la raza Salpor en Guatemala

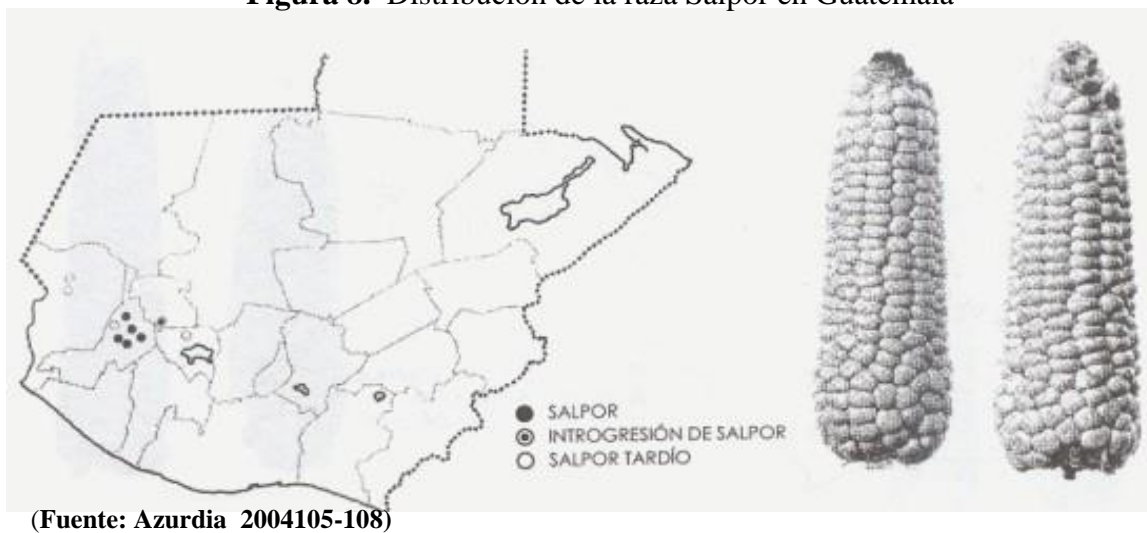


Figura 9. Serrano y su distribución en Guatemala



(Fuente: Azurdia 2004105-108)

Figura 10. Tepecintle y su distribución en Guatemala



(Fuente: Azurdia 2004105-108)

Figura 11. San Marceño y su distribución en Guatemala



(Fuente: Azurdia 2004105-108)

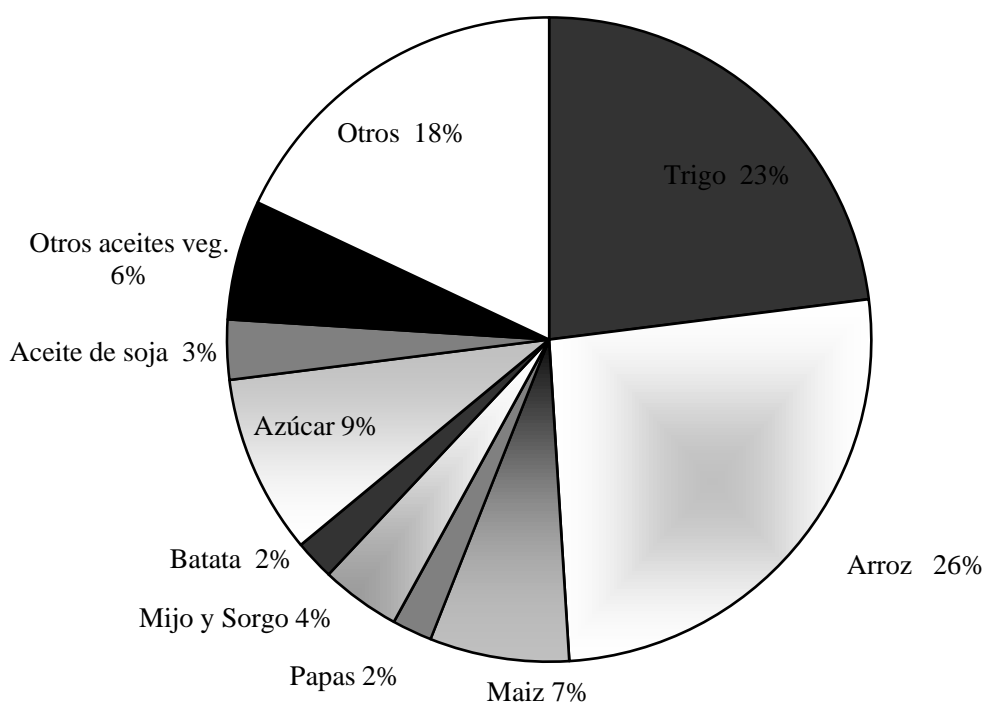
Las razas que más se presentan en la actualidad en los siete Departamentos objeto de este estudio son: Nal Tel Blanco, Tepecintle, Nal Tel-Tepecintle, Nal Tel salvadoreño y Dzit Bacal.

2.4 El maíz como recurso fitogenético para la alimentación y la agricultura.

El maíz (*Zea mays*), originario de América, representa uno de los aportes más valiosos a la seguridad alimentaria mundial. Junto con el arroz y el trigo son considerados como las tres gramíneas más cultivadas, representando según estudios de la FAO (1991), más del 50% del consumo de energía de origen vegetal de la población mundial (Figura 12).

En el transcurso del tiempo, diversas instituciones mundiales, estatales y privadas vienen realizando estudios serios con el objetivo principal de incrementar los niveles de rendimiento y de producción de nuevos y mejorados híbridos para desarrollar variedades con un alto nivel productivo, resistentes al clima y a las enfermedades.

Figura 12. Cultivos más importantes para el suministro de energía



Fuente: Hojas de balance de alimentos de la FAO, 1984-1986, Roma (1991)

Según Mario Fuentes (2001), Guatemala, El Salvador y Honduras registran los mayores niveles de consumo per cápita como alimento humano directo, en promedio hasta de 115 kg/año. En 1998 el consumo aparente de maíz en Centro América representó un volumen de 3.07 millones de tm. A la vez la región presenta una tendencia de aumento de consumo de maíz. Durante el segundo quinquenio de la década de los 90 el consumo indirecto de maíz amarillo en la región ha aumentado a partir de 4.5% por año.

Por razones históricas, biológicas, económicas y sociológicas, el maíz tiene una importancia fundamental en la cultura de Guatemala, además de representar una fuente importante de alimento. Se puede afirmar que el maíz se consume en todos los segmentos de la sociedad guatemalteca. Aún los hogares que más han asimilado el modo de vida norteamericano, desayunan corn flakes y almuerzan con tortillas.

La Secretaría de Integración Económica Centroamericana ,SIECA, (2003) reporta para Guatemala en miles de tm una producción de 1,053.6, 532.0 en importaciones, 2.8 en exportaciones, con un consumo aparente de 1,582.8.

Fuentes (1995), estima un área dedicada a la producción de maíz de 700,000 ha. El Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación presenta en su ficha informativa del maíz, 2003 la distribución en Ha /Departamento, de esta producción según maíz blanco y amarillo (Cuadro 3 y 4)

Cuadro 3. Distribución de la producción de maíz blanco en Guatemala

Rangos (Ha/Departamento)	Departamentos
>130,000	Petén
50,000 – 60,000	Huehuetenango, Quetzaltenango, Chimaltenango, Alta Verapaz
20,000 - 30,000	San Marcos, Totonicapán, Baja Verapaz, Santa Rosa, Jutiapa, Chiquimula
10,000 – 15,000	Retalhuleu, Guatemala
5,000 – 10,000	Escuintla, El Progreso y Zacapa
< 5,000	Quiché, Suchitepéquez, Sololá, Sacatepéquez, Jalapa, Izabal

Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación , 2003 www.maga.gob.gt)

Cuadro 4. Distribución de la producción de maíz amarillo en Guatemala

Rangos (Ha/Departamento)	Departamentos
20,000 – 26,000	San Marcos
10,000 – 16,000	Quetzaltenango, y Retalhuleu
6,000 – 10,000	Petén y Totonicapan
< 2,500	Jutiapa, Chiquimula y Baja Verapaz

(Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación , 2003 www.maga.gob.gt)

2.5 Problema de sequía en Guatemala y su efecto en la producción de maíz.

Las 700,000 hectáreas sembradas de maíz con un peso unitario de 1.5 toneladas por hectárea aproximadamente nos reflejan la importancia que representa el cultivo para Guatemala. El cultivo de maíz se realiza principalmente en la época de temporal (mayo – octubre) de ese total, según estimaciones del Programa de Maíz del ICTA unas 177,000 mz (el 25%) se siembran bajo condiciones que tiene limitación de humedad principalmente en los departamentos del oriente del país.

Según Michela Romani (2001) en el seminario de información económica y financiera para Centroamérica, más de 1,5 millones de centroamericanos están sufriendo las consecuencias de la sequía que impera en la región. Honduras, El Salvador y Guatemala están experimentando los efectos de la sequía más grave de los últimos tres años por lo que miles de campesinos y productores han sufrido grandes pérdidas. Por un lado las familias más pobres pierden sus cultivos de subsistencia, por el otro lado se está produciendo un desabastecimiento de granos básicos.

La escasez de lluvia afectó a Guatemala en menor grado que a los otros países centroamericanos, sin embargo, en años recientes el problema se ha hecho notorio en una

amplia franja de la costa sur que comprende zonas maiceras de vital importancia para el país.

El análisis de la tendencia de la producción de granos básicos, correspondiente al mes de julio evidenció una merma de maíz y frijol debido a la presencia de canículas cada vez más prolongadas y recurrentes en la parte oriental y costa sur del país. Esta situación profundiza el problema de disponibilidad de alimentos en los agricultores que practican una agricultura de subsistencia y que a un en épocas normales tienen limitada producción. Las lluvias finales de julio generan una moderada recuperación agrológica, sin embargo en suelos degradados el daño es irreversible.

En los anexos A y B se presentan mapas que contiene los registros de lluvias históricas y registros de las temporadas de lluvias para Guatemala en los meses de mayor importancia para el cultivo. El anexo B, mapa presentado en forma de isolíneas, muestra las zonas del territorio nacional donde se tiene mayor probabilidad de tener problemas relacionados con déficit de agua o sequías.

El tercer mapa, anexo C, contiene información de las zonas con susceptibilidad baja, media, alta y sin susceptibilidad a sequías. (MAGA 2001) Principalmente la problemática se concentra en áreas definidas del oriente (Chiquimula, El Progreso, Jutiapa), regiones del Quiché y Baja Verapaz y la franja de la costa sur entre los departamentos de Escuintla, Suchitepéquez, Retalhuleu y San Marcos.

Entre las variables ambientales que intervienen en el crecimiento y en el desarrollo de la planta, la diferencia de agua o tensión hídrica es una de las más importantes. Todas las plantas superiores están expuestas a la desecación, al menos una vez durante su ciclo de vida, cuando la semilla madura y se seca. Comúnmente las plantas están expuestas a otros períodos de sequía ligera o intensa durante sus fases de crecimiento vegetativo o reproductor.

El efecto de la sequía afecta la habilidad de la planta de maíz a producir grano en tres fases críticas del crecimiento vegetativo: a) Al inicio del ciclo de cultivo (siembra-plántula); b) en fase de floración y c) en fase de llenado de grano. Se han realizado diferentes estudios en maíces tropicales para simular y cuantificar potencialmente el efecto de la reducción del grano por efecto de sequía. La reducción de agua en el cultivo

del maíz durante el período de prefloración, floración y post-floración provoca pérdidas de 25%, 50% y 21%, respectivamente.

El momento crítico de estrés de sequía de maíz se ubica entre los 7 días previos al inicio de la floración y 15 días posterior a esta. En ésta etapa la reducción de rendimiento es mayor y puede ser 2 o 3 veces mayor que en otra fase de crecimiento. Se indica también que en esta fase el número de granos puede reducirse hasta en 45%.

El Instituto de Sismología, Vulcanología, Meteorología e Hidrología, INSIVUMEH, (1984) y Fuentes *et al.* (2002), a través de diferentes estudios de la variabilidad climática, indican que el período de canícula (período sin precipitación), se produce principalmente entre los meses de junio a agosto, llegando a tener una duración de hasta 40 días. Coincidentemente, la canícula ocurre durante la fase reproductiva del cultivo de maíz, que es la fase fisiológica en la cual más agua necesita y que también es la fase en la cual se reduce más el rendimiento.

Sumado a la condición de limitación de humedad, en muchas de esas áreas los suelos son muy superficiales o no tienen la suficiente capacidad para retener agua y las temperaturas son de las más altas en el país, por lo que los efectos de la poca precipitación en algunas épocas se hacen más severos.

2.5.1 Tolerancia del maíz a condiciones de humedad limitada.

El maíz en la zona tropical raramente es cultivado bajo riego y la variabilidad natural en la cantidad y distribución de la lluvia significa que el estrés de sequía puede ocurrir en cualquier momento del ciclo de su cultivo. El maíz cultivado en las tierras bajas necesita al menos 500 mm de lluvia bien distribuida a lo largo de todo el ciclo de cultivo; en la práctica el cultivo se realiza, por lo general, en áreas que reciben de 750 a 1 750 mm anuales. La severidad del estrés de sequía puede ser cuantificada en base a la extensión del secado del suelo, de la reducción de la transpiración relacionada con el potencial de evapotranspiración o del estado de la planta (Lafitte 2001).

Las fuentes de agua en Guatemala son escasas y la implementación de un sistema de riego eleva los costos de producción. Ante esta dificultad los científicos han aprovechado los conocimientos sobre genética y mejoramiento de plantas, planteando la posibilidad de reducir el efecto de la limitación de humedad por medio de la acumulación

de genes que sean favorables para lograr mejores rendimientos y/o tolerar este tipo de estrés, se define la resistencia a la sequía como la capacidad de la planta para rendir en climas semiáridos. Estima que cuando se hace mejoramiento genético para sequía con el objeto de obtener altos rendimientos, es más conveniente hacerlo en condiciones adversas.

Numerosos artículos publicados en revistas y libros tratan de las respuestas del maíz a la tensión hídrica (Lafitte 2001). El tema es tan amplio que cada año surgen nuevos estudios, no se pretende abarcar los numerosos aspectos de las respuestas de este cultivo al efecto del agua, sino únicamente citar estudios recientes que hacen énfasis sobre los temas de mayor interés para fitomejoradores o biólogos con poca experiencia en el tema. Para mayor detalle se puede hacer referencia a estudios realizados por H. R Lafitte, 2001 publicados en el libro *El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción*, Colección del Departamento de Producción y Protección Vegetal de la FAO.

El impacto de un período de restricción en la disponibilidad de agua sobre el crecimiento del cultivo es influenciado por numerosos factores, tales como la etapa de crecimiento del cultivo e historia del mismo, el área foliar, el volumen de las raíces, el déficit de la presión de vapor atmosférica, la temperatura y la radiación. Es difícil, por lo tanto, comparar los niveles de las sequías a través de los años, aún si el mismo nivel de estrés apareció en un momento particular del crecimiento del cultivo.

La sequía restringe la fotosíntesis tanto por limitaciones en los estomas o por limitaciones bioquímicas. La señal directa para el cierre de los estomas no se conoce claramente aún, pero los datos obtenidos con la aplicación de un modelo reciente que incorpora señales hormonales de las raíces -ácido abscísico en la corriente del xilema- y predice cambios en la demanda evaporativa de la conductibilidad estomatal y en el contenido de agua de la hoja, son consistentes con los datos observados en el maíz (Lafitte 2001).

La sequía que ocurre durante el período de floración del maíz es la más determinante para el rendimiento de grano, según determinó Sopher (1973), citado por Pérez (1979). En el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo –CIMMYT-

se han realizado estudios relacionados con el mejoramiento de germoplasma para condiciones de sequía.

Trabajos realizados por Bolaños (1988, 1993, 1997) han permitido establecer que el parámetro más importante para seleccionar materiales resistentes a sequía, es el intervalo entre la floración femenina (extrusión de estigmas) y la masculina (anthesis), pero que la sincronización de floraciones no es garantía para la producción bajo estrés, por lo que se requiere la siembra de viveros para lograr la expresión de la variación genética en esas condiciones.

Después que se identifique un rasgo que, en teoría, debe estar asociado con la adaptación o las condiciones adversas de la sequía, y se desarrolla una técnica adecuada para medir este rasgo, debe evaluarse el germoplasma disponible para la variabilidad. Las evaluaciones iniciales deberán llevarse a cabo sobre las variedades de cultivo agronómica aceptables o sobre genotipos que están muy relacionados con las variedades aceptables. Si es posible encontrar una variabilidad significativa en este tipo de germoplasma y si se encuentra que el rasgo está relacionado con la productividad, entonces puede reducirse el tiempo requerido para desarrollar una variedad. Cuando se encuentra una variabilidad significativa en la expresión del rasgo seleccionado, debe establecerse relación entre este rasgo y la productividad. Es necesario establecer las relaciones teóricas y directas (Lafitte 2001a).

Desarrollar germoplasma que se adapte bien a las condiciones de sequía de las áreas del país mencionadas, especialmente de la región de oriente (Zacapa, El Progreso, Chiquimula, Jutiapa y Jalapa) y localidades de la costa sur-occidental, puede coadyuvar a resolver el problema de escasez de alimentos, ya que la mayoría de agricultores de esas regiones producen mayormente para autoconsumo.

Adicionalmente, los excedentes de producción pueden permitir ingreso de dinero para satisfacer otras necesidades de la familia. Como se mencionó con anterioridad el maíz es una fuente importante de alimento para los guatemaltecos, con un consumo per cápita de 115 Kg/año. Esto dimensiona la importancia, implicaciones y vulnerabilidad de la seguridad alimentaría del país debido al efecto de la sequía.

2.6 Métodos de análisis y evaluación de la diversidad genética.

La diversidad se puede estudiar a varios niveles de organización, desde los ecosistemas hasta niveles celulares, subcelulares y moleculares. Son numerosos los métodos existentes para determinar el grado de variación genética entre distintas plantas o poblaciones (FAO 1996a). El uso de una metodología en particular varía en función del tipo de información que se necesite (Cuadro 5).

Existen métodos basados en la morfología que permiten analizar las diferencias de rasgos observables entre las distintas plantas. Estos métodos son relativamente económicos y constituyen la base de la caracterización de las muestras de los materiales almacenados en los bancos de germoplasma.

Existen también métodos moleculares que permiten analizar las diferencias entre proteínas o el ADN de las plantas. En la actualidad se cuenta con una amplia variedad de técnicas moleculares disponibles y constantemente están surgiendo otras nuevas, sin embargo, los métodos más nuevos por lo general requieren equipo y suministros más complejos (Hammer *et al.* 1999:29). En la actualidad, muchos de los estudios sobre conservación se basan en los análisis genéticos, a través del uso de **marcadores moleculares** de ADN.

Según la FAO, 1996a, el estudio y análisis de la diversidad genética de los recursos fitogenéticos basados en métodos morfológicos, bioquímicos y moleculares puede servir para:

- Identificar las zonas con diversidad genética elevada;
- Determinar las prioridades de recolección y las estrategias de muestreo;
- Orientar para la designación de zonas de conservación *in situ* o en fincas;
- Vigilar la erosión genética.
- Orientar sobre la ordenación de las colecciones *ex situ*
- Aumentar al máximo la diversidad genética elegida por las colecciones básicas;
- Comparar las regiones con utilidad agronómica del genoma de distintos cultivo

- Definir la identidad de las variedades mejoradas o de otros recursos fitogenéticos
- Vigilar los desplazamientos de los recursos fitogenéticos.

Cuadro 5. Ventajas y desventajas de algunos métodos utilizados para medir variación genética.

Método	Variación Detectada	Loci analizados por ensayo	Tipo de característica analizada	Herencia de la característica analizada	Nivel tecnológico necesario
<i>Morfología</i>	Baja	No. bajo	fenotipo	Cualitativa/ Cuantitativa	bajo
<i>Isoenzimas</i>	Media	No. bajo	proteína	codominante	medio
<i>FRLP</i>	Media	No. bajo (específico)	ADN	codominante	alto
<i>AFLP</i>	media-alta	No. alto (aleatorio)	ADN	dominante	alto
<i>Microsatélites</i>	Alta	No. medio (específico)	ADN	codomiante	alto

(Fuente. FAO, 1996^a:10)

2.6.1 Marcadores moleculares, herramienta para estudios de diversidad genética. El estudio de la diversidad genética como paso primordial para su conservación y utilización, requiere del empleo de todas las técnicas y herramientas modernas disponibles. En este sentido la biología molecular, juega un papel importante, ya que mediante la aplicación de la misma se puede ampliar la gama de medio disponibles para alcanzar los objetivos de todo programa de conservación. Hasta hoy se han logrado algunos avances que han marcado una época en el desarrollo de las ciencias biológicas. Este rápido desarrollo de la biología molecular y su potencial en la manipulación y mejoramiento de plantas ha dado origen a la biotecnología moderna (Azurdia 1999:89).

Con el surgimiento de las técnicas de biología molecular se hizo posible la manipulación de ADN, que contribuyó al surgimiento de varios tipos de marcadores moleculares. Los marcadores moleculares poseen diferentes aplicaciones en la genética y en el mejoramiento genético de plantas, como en estudios de diversidad genética,

protección de cultivares, (“fingerprinting”), análisis de pureza genética, presenta una herramienta en programas de retrocruzamiento, construcción de mapas genéticos e identificación de marcadores asociados a caracteres de interés. (Valdez-Moctezuma y Kahl 2000:45)

Hay varios tipos de marcadores moleculares que pueden confirmar la presencia de un gen o bien localizar su posición en el cromosoma. Los marcadores moleculares de ADN permiten al genetista determinar los genes y su arreglo en los cromosomas sin necesidad de observar la expresión de la característica. (Becerra y Paredes 1999:270)

En resumen y de forma metafórica se puede describir un marcador como una señal de humo dentro de la información hereditaria (el ADN) que nos permitirá identificar la presencia de un gen a gran distancia y de forma sencilla.

Los marcadores moleculares son una herramienta para estudiar la diversidad alélica que presentan las poblaciones. (Nei 1986:238) Además, y en contraste a los caracteres morfológicos, la expresión a nivel de ADN es generalmente independiente de las influencias medio ambientales.

Las frecuencias alélicas, detectadas mediante técnicas electroforéticas, permiten obtener datos cuantitativos sobre la diversidad de las muestras (materiales nativos) y con ello caracterizar e incluso identificar ese material de modo preciso.

Sin embargo, la utilización de los marcadores moleculares es restringida. Actualmente en Guatemala no se reportan estudios realizados a ese nivel para el cultivo de maíz.

En 1999 en el Cimmyt, México, donde se ha venido trabajando en el desarrollo de maíz tolerante a sequía, se llevó a cabo el “Taller de acercamientos moleculares para el mejoramiento genético de cereales para la producción estable en ambientes secos”. En el reporte de planificación estratégica generado en dicho taller, se señalan entre otras actividades prioritarias para la búsqueda de materiales tolerantes, las siguientes:

- La caracterización de ambientes meta (evaluación genoma x ambiente)
- Continuar la caracterización del germoplasma
- Seleccionar alelos elite, involucrados en la expresión de componentes de rendimiento.
- Explorar la variabilidad genética (fenotípicamente y con marcadores

Con este trabajo de tesis estaremos caracterizando y determinando la variabilidad genética del germoplasma de maíz de zonas secas de Guatemala, que son parte de las actividades recomendadas por CIMMYT, a nivel internacional, para la conservación y búsqueda de germoplasma tolerante a sequía, a emplearse en mejoramiento genético. Además a través de su conservación en el banco de germoplasma del ICTA, estaremos evitando la pérdida de variabilidad genética del maíz nativo y asegurando la disponibilidad de este material para su uso.

2.6.1.1 Marcadores Microsatélites (SSR- Simple Sequence Repeat).

Con relación a la utilización de marcadores moleculares para apoyar los procesos de selección y conservación de germoplasma, los microsatélites constituyen una técnica muy útil para acelerar la identificación y selección de materiales a emplearse en los programas de conservación y mejoramiento. Estos se vienen empleando en plantas para: mapeo genético, mejoramiento asistido, para establecer relaciones filogenéticas y para analizar y caracterizar germoplasma de colecciones almacenadas en bancos. (Karp 1997:46; Powell et.al. 1996:228; Rao 1994:7)

El ADN satelital fue descubierto en 1960 por científicos que descubrieron que cuando centrifugaban sobre ciertas condiciones, éste se presentaba en dos o más capas; una banda principal conteniendo genes y bandas secundarias, denominadas bandas satelitales. Las bandas satélites revelaban largas secuencias de ADN repetidas. En 1985 Alec Jeffreys, de la universidad de Leicester encontró regiones menores conteniendo secuencias de ADN repetitivas, a las cuales llamo minisatélites, éstas consistían en repeticiones de 15 ó más pares de bases.

Al final de los años ochenta L. James y colaboradores aislaron satélites compuestos de repeticiones de bases aún menores y llamaron a esas repeticiones microsatélites.

El ADN microsatelital consiste de unidades de 1-6 nucleótidos repetidos en tándem. (Becerra y Paredes 1999:281) Las secuencias satelitales se encuentran presentes en todas las células eucariotas y se ubican en *loci* específicos distribuidos sobre los genomas, tanto en regiones codificantes como no codificantes, (Hernández 2005:18) lo

que da lugar a la obtención de patrones de bandeo individuales y específicos para cada organismo cuando se analiza su genoma. (Valdez-Moctezuma y Kahl 2000:147)

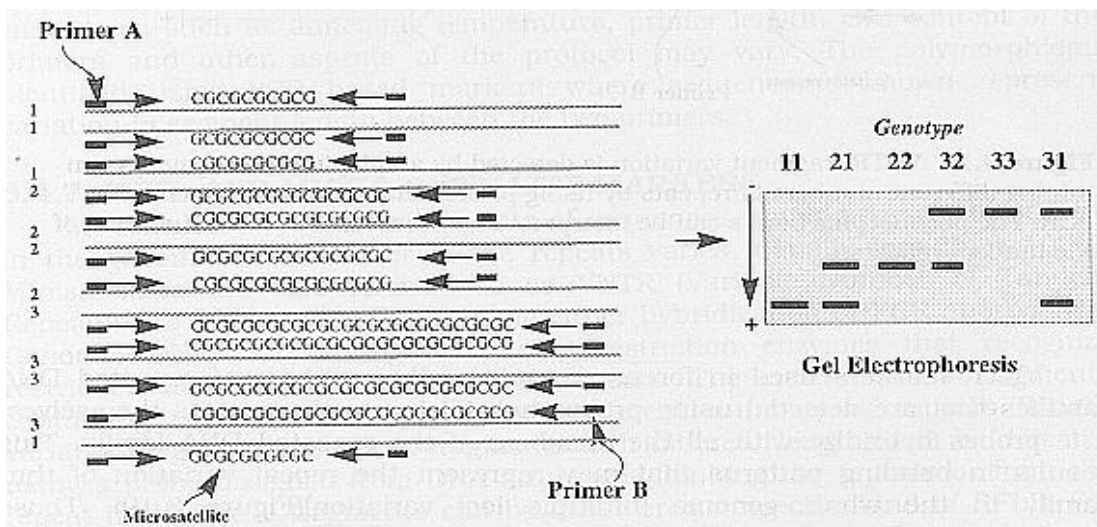
La técnica de microsatélites se basa en el uso de dos pares de imprimadores o primers, secuencias adyacentes a la región microsatelital, y en la reacción de la cadena de polimerasa (PCR) para detectar variaciones en locus de secuencias repetitivas. Las técnicas de SSR liberan polimorfismo en un locus debido a diferencias en el número de veces en el que un dinucleótido aparece en ese locus (Figura 13).

Estas variaciones en el número de repeticiones consisten en las variaciones de la longitud del segmento, que representarán cambio en el peso molecular, detectadas por la reacción en cadena de la polimerasa. La tasa de mutación de estas secuencias repetitivas es en general, 10 a 100 veces mayor que las otras regiones del genoma, por lo tanto son secuencias de alta tasa evolutiva.

Algunos ejemplos de microsatélites que se han utilizado para la obtención de huellas genómicas son: (GATA)₄, (GACA)₄, (TCC)₅, (GTG)₅, (GGAT)₄, (CT)₈ Y (CA)₈ (Valdez-Moctezuma y Kahl, 2000:147).

Figura 13. Ejemplo de regiones microsatélites

Para un microsatélite contenido en un determinado locus, un primer específico para ese locus es diseñado por la secuencia flanqueante al microsatélite. La distancia de separación de las bandas estará basada en un cambio en la longitud (pb) del microsatélite.



(Fuente. 39.768 PLANT MOLECULAR GENETICS www.umanitoba.ca/)

En resumen se puede decir que por medio de esta técnica se puede medir la diversidad entre genotipos amplificando mediante **PCR** la región de ADN genómico que contiene estas secuencias repetidas, utilizando las secuencias adyacentes o **imprimadores** (primers) que nos permitirán detectar cambios, basados en patrones de bandas electroforéticamente diferentes, resultado de diferencias en un locus específico. Estos patrones se manifiestan en fragmentos de longitudes variables, que luego pueden observarse por medio de tinción con sales de plata, bromuro de etidio, o por métodos radioactivos. (Valdez-Moctezuma y Kahl 2000:147)

Los diferentes patrones de bandeo que exhibe el genoma de cada individuo, pueden traducirse a dendrogramas o árboles filogenéticos con el uso de métodos estadísticos y programas de computación adecuados, lo que permitirá definir de manera más clara la relación a nivel de ADN entre los individuos de una determinada población. (Valdez -Moctezuma y Kahl 2000:147)

Los microsatélites son considerados de los marcadores moleculares más importantes debido a su alto nivel de polimorfismo que permite una discriminación precisa entre individuos altamente emparentados, además, son altamente reproducibles y estables dentro de una determinada especie. (Becerra y Paredes 1999:281)

A pesar que la técnica SSR es de fácil ejecución, los polimorfismos generados necesitan de genes de alta resolución para detectar diferencias de pocos pares de bases entre los segmentos amplificados, la mayor limitación de este método es la obtención de los primers específicos que flanquean las regiones altamente repetitivas o los microsatélites. Esta etapa requiere de bibliotecas genómicas enriquecidas con los microsatélites de interés, metodologías eficientes para la investigación de esta biblioteca y el secuenciamiento de ADN en larga escala, necesitando laboratorios con una infraestructura bastante especializada. En la actualidad esta limitante está siendo vencida si nos referimos a especies de importancia económica debido a que ya existe en el mercado un gran número de primers SSR, posibilitando el uso de esta técnica con la misma estructura utilizada para RAPD o PCR convencional (Cursos Bases Moleculares para la Caracterización y Manipulación del Germoplasma 2005).

Aunque el uso de marcadores moleculares en estudios de germoplasma y diversidad genética es limitado por el costo y los reactivos, y en algunos casos por el elevado costo de los equipos, los avances técnicos que estas tecnologías han alcanzado en los últimos años, los hacen más accesibles a los investigadores y a los programas de conservación y mejoramiento. Este tipo de análisis es complementario a la caracterización morfológica y agronómica del germoplasma y es de mucha utilidad para el entendimiento de la diversidad y estructura genética de las poblaciones, especies y taxa.

III. OBJETIVOS

3.1. General

- Determinar la diversidad genética de germoplasma nativo de maíz de las zonas secas de Guatemala

3.2. Específicos

- Identificar los alelos que caracterizan las 21 colecciones de maíz que en evaluaciones de campo han demostrado tolerancia a sequía.
- Recopilar información genética útil la conformación de colecciones núcleo de este cultivo.
- Generar información básica de utilidad para el mejoramiento del cultivo, enfocado a reducir la pérdida de rendimiento debido a las condiciones de humedad limitada.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

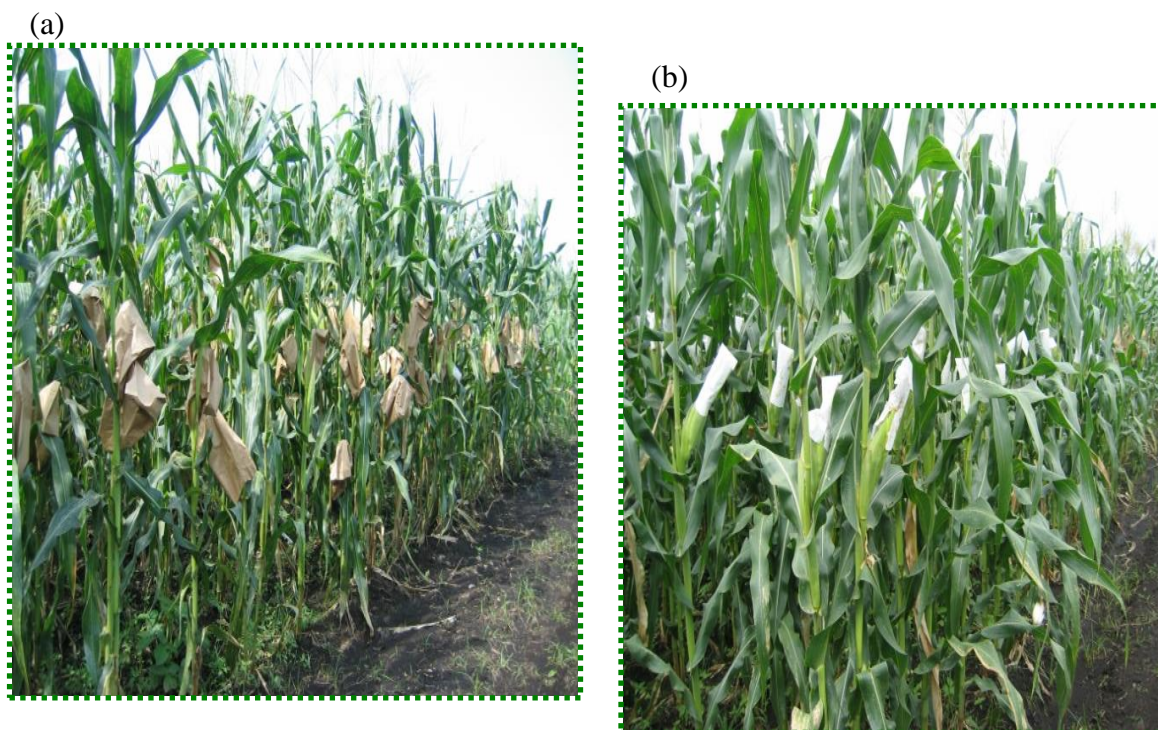
4.1 Colecta de materia.

El germoplasma de maíz de las colecciones de los departamentos de El Progreso, Jutiapa, Jalapa, Zacapa, Chiquimula, Huehuetenango y Baja Verapaz fue regenerado en las estaciones del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) localizadas en La Máquina (Suchitepéquez), Labor Cuyuta (Escuintla) y Jalapa, Jalapa. De este germoplasma se obtuvieron las hojas para la extracción de ADN (Figura 14).

Se seleccionó la penúltima hoja más joven de 10 individuos de cada colección teniendo el cuidado de escoger material sano (libre de infecciones visibles).

Se cortó desde la punta de cada hoja un cuadro de aproximadamente ocho centímetros de largo el cual se colocó en una bolsa de papel Kraft de 10 x 10 cm, debidamente identificada con el lugar de colecta, número de colección y número de individuo, fecha de colecta y nombre del colector.

Figura 14. Colecciones de maíz regeneradas en La máquina (a) y Labor Cuyuta (b)



Fotos tomadas por Ing. Mario Fuentes (ICTA)

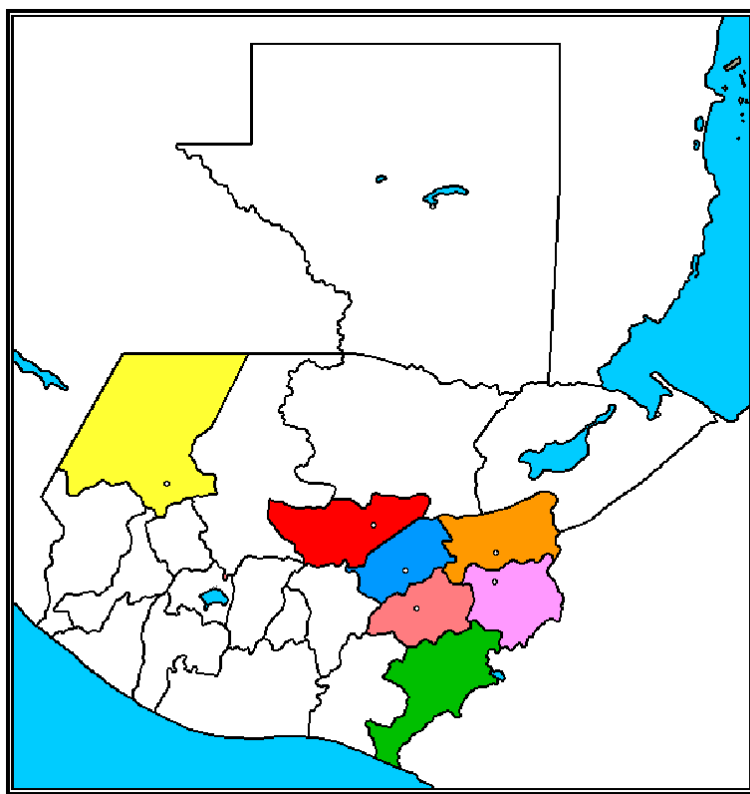
De un total de 80 colecciones regeneradas se eligieron 21, identificadas como la fracción superior, luego de su caracterización agronómica y evaluación en campo para tolerar estrés de sequía. Se eligieron tres colecciones por departamento, a excepción de Chiquimula, del que se eligieron cuatro porque la 76 y 77 presentaban seis y cuatro individuos respectivamente (Cuadro 6).

El material colectado se trasladó en hieleras hasta el Banco de Germoplasma, del ICTA, donde se almacenó a -20° C.

Cuadro 6. Lugar de procedencia del material vegetal colectado

No.	Colección	Agricultor	Municipio	Depto.
1	11	Gonzalo Morales	Sanarate	El Progreso
2	14	Luciano Barrientos	Sanarate	El Progreso
3	19	Emetrio Sandoval	Sanarate	El Progreso
4	36	Carlos Arturo Cruz	Jutiapa	Jutiapa
5	46	Andrés Gutiérrez	Agua Blanca	Jutiapa
6	48	Amílcar Adolfo Hernández	Quezada	Jutiapa
7	56	Maximiliano Gregorio	San Luis Jilotepeque	Jalapa
8	63	Estanislao Esteban	San Pedro Pinula	Jalapa
9	72	Juan Arévalo	San Manuel Chaparrón	Jalapa
10	73	Camila Gutiérrez	La Unión	Zacapa
11	74	Manuel Coronado	San Diego	Zacapa
12	75	Luis Gómez	San Diego	Zacapa
13	76	Jose Humberto García	Jocotán	Chiquimula
14	77	Benedicto Méndez	Olota	Chiquimula
15	79	Esteban Molina	Jocotán	Chiquimula
16	84	Maximino Guerra García	Concepción Las Minas	Chiquimula
17	106	Domingo Figueroa	Santa Ana Huista	Huehuetenango
18	107	Rigoberto Godínez	Jacaltenango	Huehuetenango
19	108	Tiburcio Sic	San Rafael Rabinal	Baja Verapaz
20	109	Agustín Hernández	La Paz	Baja Verapaz
21	110	Francisco González	San Miguel	Baja Verapaz

Figura 15. Mapa, Departamentos donde se colectó el germoplasma de maíz nativo



4.2 Aislamiento del ADN.

Los problemas con el aislamiento de ADN, específicamente de plantas, son la presencia de actividades de enzimas nucleasas tales como la ADNasa y otras macromoléculas que son aisladas simultáneamente durante el proceso de purificación (Valdez-Moctezuma y Kahl 2000:140).

Para la remoción de todas las impurezas y la obtención de un ADN de calidad utilizable se han usado en diferentes protocolos y a diversas concentraciones agentes como EDTA y SDS con el objetivo de inhibir la actividad enzimática.

La presencia de compuestos fenólicos regularmente es reducida con la adición de PVP en el aislamiento inicial. Un reactivo utilizado en varios procedimientos es el CTAB, el cual se pega fuertemente al ADN, despliega las proteínas y previene la degradación (Valdez-Moctezuma y Kahl 2000:140). El CTAB se remueve mediante

extracciones con cloroformo y el ADN permanece en fase acuosa listo para ser precipitado con etanol. El protocolo empleado para la extracción de ADN de las hojas de maíz, incluye estos reactivos, según el método de Doyle & Doyle 1990.

4.2.1 Protocolo de Extracción. Se extrajo el ADN de 10 hojas de plantas de maíz de un promedio de seis y ocho semanas, provenientes de 10 individuos por colección de las 21 colecciones de maíz nativo de las zonas secas de Guatemala.

1. Con un sacabocado se cortaron 5 rueditas de cada hoja de maíz, colocándolas en un mortero (Figura 16) con 1ml de tampón o buffer de extracción y macerando hasta obtener una emulsión.

Figura 16. Material vegetal utilizado para aislamiento de ADN



Tampón o Buffer de extracción (1000 ml)

NaCl 5.0M	280 ml
Trizma base / HCl (pH 8.0, 1.0M)	100 ml
¹ EDTA (pH 8.0, 0.5M)	40 ml
² CTAB	20 g
PVP soluble	10 g
Aforar com agua bidestilada autoclavada hasta	1000 ml

¹ Ver listado de siglas y abreviaturas

² Ver listado de siglas y abreviaturas

2. La emulsión se trasladó a un eppendorf (Figura 17) añadiéndole seguidamente 120µl de N-Lauroylsarcosine al 5% (sarcosil) y agitando vigorosamente en vortexer Mini vortexer marca Fisher Scientific).

Figura 17. Material vegetal macerado



3. Los eppendorf conteniendo el extracto vegetal y el N-Lauroylsarcosine al 5% fueron colocados en un baño de temperatura controlada (Isotemp 102S marca Fisher Scientific) a 55° C por 1 hora.

4. Transcurrida la hora se retira, dejando enfriar 10 minutos.

5. Se agregaron 400 µl de Cloroformo a cada eppendorf, agitando vigorosamente hasta obtener una emulsión. Finalmente centrifugar (modelo 415D marca Eppendorf) a 13,000 rpm a 4° C durante 10 minutos.

6. Luego de la centrifugación, la fase superior acuosa se trasladó a un nuevo eppendorf, añadiéndole 400 µl de isopropanol frío a cada eppendorf, dejando al menos una hora a 0° C

Figura 18. Equipo utilizado en la extracción



Baño de temperatura controlada



Mini Vortex

7. Inmediatamente luego de retirar del frío se sometieron a centrifugación a 13,000 rpm a 4° C, durante 10 minutos.
8. Con cuidado de no perder el precipitado, se vertió por completo el líquido en un beaker autoclavado y el eppendorf con el precipitado se dejó secar por 15 min.
9. Luego de los 15 minutos se añadió 1 ml de etanol a 76% a cada eppendorf agitando en vortexer para luego centrifugar de nuevo a 13,000 rpm a 4° C durante 10 minutos.
10. Se eliminó el sobrenadante cuidadosamente, dejando secar los tubos a temperatura ambiente por 45 minutos o hasta que estuviera completamente seco el ADN.
11. Finalmente se resuspendió el precipitado en 100 µl de agua bidestilada o TE
12. El ADN extraído se conservó a 5°C durante el tiempo que duro el estudio.

4.3. Cuantificación de ácidos nucleicos.

Para cuantificar la cantidad de ADN/ARN, la lectura debe hacerse a longitudes de onda de 260 nm, lo cual permite el cálculo de la concentración de los *ácidos nucleicos* en la muestra (Moctezuma y Kahl 2000:140). Conocer las concentraciones a las que se encuentra el ADN nos es útil al momento de realizar las diluciones para lograr la concentración óptima en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) por sus siglas en inglés.

4.3.1 Protocolo de cuantificación. La cuantificación se llevó a cabo

espectrofotómetro (espectro UV visible Smartspec 300 marca Bio-rad).

- Se agregó 5 µl del ADN obtenido de las muestras en un tubo que con 1995 µl de agua bidestilada o TE, dependiendo de en qué esté resuspendido el ADN, y se mezcló hasta lograr una mezcla homogénea

- Se introdujo un factor de dilución de 200 en el espectrofotómetro.
- Luego se vertió la mezcla a la cubeta de cuarzo del espectrofotómetro y se introdujo el mismo en el espectrofotómetro.
- La absorbancia fue leída en el espectrofotómetro a 260 y 280 nm.
- Una vez conocida la concentración de ADN presente en cada una de las muestras, el ADN se diluyó a una concentración de 10 ng/ µl para emplearse en la PCR.

Fórmula 1. Concentración de ADN

$$\text{Concentración de ADN (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = [\text{DO}_{260} * 1000(\text{factor de dilución}) * 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}] / 1000$$

4.4. Amplificación del ADN por PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una tecnología que se utiliza para sintetizar *in vitro* fragmentos específicos de ADN con la finalidad de detectar una secuencia o gen de interés en el genoma de un individuo, siempre y cuando se conozca parte de su secuencia de nucleótidos (Valdez- Moctezuma y Kahl 2000:145).

Para la PCR se utilizan dos **oligonucleótidos** sintéticos de unos 15-20 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar (microsatélites). Estos oligonucleótidos se conocen habitualmente como “**primers**” y actúan como cebadores para la síntesis *in vitro* del ADN.

Los primers o imprimadores se agregan en exceso a una fuente de ADN, en presencia de una enzima catalítica (**taq polimerasa**) resistente a las fluctuaciones de temperatura, un buffer o amortiguador apropiado, y una mezcla de **desoxirribonucleótidos** trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Hoelzel y Green).

La PCR consiste en tres pasos esenciales: el primero es la **desnaturalización**, este paso separa mediante temperaturas de entre 90 y 95° C la doble hebra del ADN a un par de cadenas sencillas, que sirven como moldes para la síntesis de los fragmentos respectivos. El segundo paso es denominado **hibridación o anillamiento**, en este paso se

disminuye la temperatura hasta un rango entre los 40 y los 60° C, esta temperatura (conocida como temperatura de anillamiento) depende exclusivamente de el par de primers utilizados ya que en este paso éstos se unirán con las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar (Entrala 2000).

La temperatura de anillamiento de un primer va a estar determinada por varios factores y es relativamente específica para cada primer. La longitud de los primers y la secuencia que los conforma son críticas en la designación de los parámetros de una amplificación.

En el último paso ocurre el alargamiento de la cadena por lo que es conocido como **extensión**. Durante este paso la **Taq Polimerasa** incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturizada. Normalmente esta extensión ocurre a 72° C ya que es la temperatura a la cual la Taq-polimerasa alcanza su máxima actividad (Entrala 2000).

Estos pasos ocurren regularmente a tiempos específicos y es necesario que se repitan por varios ciclos, para esto es utilizado un equipo especial capaz de programar la cantidad necesaria de ciclos para lograr una amplificación exitosa. Es importante que todos los componentes estén libres de contaminación, de lo contrario se podría obtener falsos resultados.

4.4.1 Selección de primers o imprimadores. El genoma del maíz

presenta una dotación cromosómica diploide con un juego básico de diez cromosomas (Paliwal 2001:276). Según la base de datos genética del maíz (Maize MDB, 2005), aproximadamente 50,000 genes residen dentro de estos 10 cromosomas. Estos contienen cerca de 2.5 billones de pares de bases, constituyentes principales de la de la doble cadena de ADN. Secuencias de estos pares de bases en el ADN repetidas en tandem, son las conocidas como secuencias satelitales, estas secuencias, tienen dos extremos flanqueantes que son las secuencias conocidas como primers y son las utilizadas como sondas para localizar los microsátélites distribuidos en el genoma.

La elección de los primers se determinó tomando en cuenta los siguientes criterios

- Localización en el cromosoma (Bin), con el fin de maximizar la cobertura genómica.
- Longitud de cada uno de los primers (comprendida entre 18 y 24 bases).
- Relación bases púricas: bases pirimidínicas (relación 1:1).
- Nivel de polimorfismo (altamente polimórficos).

Con el objetivo de lograr la mayor cobertura genómica se eligieron nueve primers o imprimadores, “*Pioneer high bred*” o *phi* y “*University of Missouri Columbia*” o *umc*, distribuidos uniformemente sobre el genoma, uno por cromosoma (Cuadro 7).

Tres primers (phi 022, phi 011 y phi 96100) fueron eliminados de este estudio debido a que luego de las respectivas pruebas no mostraron resultados analizables.

4.4.2 Protocolo de amplificación. La amplificación del ADN se

llevó a cabo según la metodología del Laboratorio de genética molecular aplicada del CIMMYT (1998). La mezcla de amplificación se preparó en un tubo eppendorf de 0.5 ml que contenía 10 µl de mezcla madre o master mix y 5 µl de ADN de la muestra a amplificar a una concentración de 10 ng/ µl.

Master mix

Agua bidestilada autoclavada	1.30 µl
Taq Buffer 10X	1.50 µl
MgCl ₂ 50mM	1.60 µl
DNTP mix 1M (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	0.90 µl
Primer F 2.5µM*	2.25 µl
Primer R 2.5µM	2.25 µl
Taq Polimerasa 5U/ µl	0.20 µl

* Todos los primers utilizados son marca Sigma.

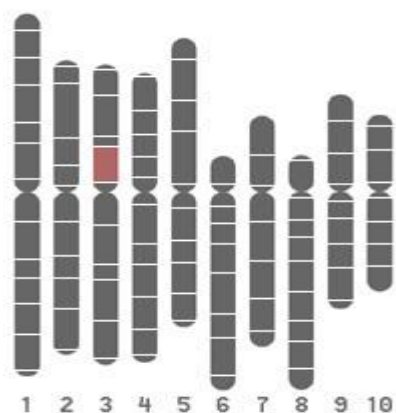
Cuadro 7. Lista de primers o imprimadores seleccionados

Primer	Bin*	Rango (Kb)	Tm**	MW	Nmol	Secuencias
Phi 029F	3.04	148-162	75.0	8474.3	56.0	TTGTCTTTCTTCCTCCACAAGCAGCGAA
Phi 029R	3.04	148-162	74.5	8532.4	50.4	ATTTCCAGTTGCCACCGACGAAGAACTT
Phi 093F	4.08	229-314	73.5	7931	33.	AGTGCCTCAGCTTCATCGCCTACAAG
Phi 093R	4.08	229-314	79.1	9223.9	52.4	AGGCCATGCATGCTTGCAACAATGGATACA
Phi 024F	5.01	361-371	73.9	7588.9	44.7	ACTGTTCCACCAAACCAAGCCGAGA
Phi 024R	5.01	361-371	70.0	7111.4	40.0	CGCTTCATCTCCCGTGACAATG
Phi 089F	6.08	79-107	71.6	7035.5	38.9	GAATTGGGAACCAGACCACCCAA
Phi 089R	6.08	79-107	72.7	6990.4	45.8	ATTTCCATGGACCATGCCTCGTG
Phi 034F	7.02	113-149	68.1	6726.2	47.4	TAGCGACAGGATGGCCTCTTCT
Phi034R	7.02	113-149	71.8	6124.8	67.3	GGGAGCACGCCTTCGTTCT
Umc 1061F	10.06	93-113	66.3	7066.5	63.7	AGCAGGAGTACCCATGAAAGTCC
Umc1061R	10.06	93-113	67.0	7394.7	56.5	TATCACAGCACGAAGCGATAGATG

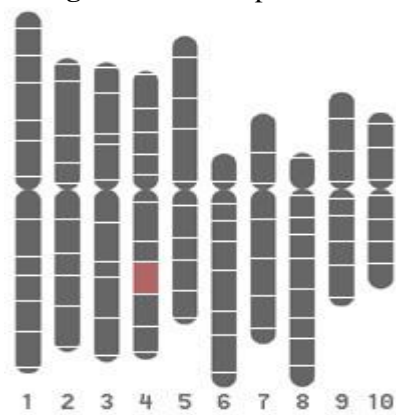
Fuente: Hoja de reactivos Sigma

* Bin = Cada segmento en el que esta dividido un cromosoma, el segmento es designado con el número del cromosoma seguido de dos dígitos de decimales que determinan la posición en el cromosoma

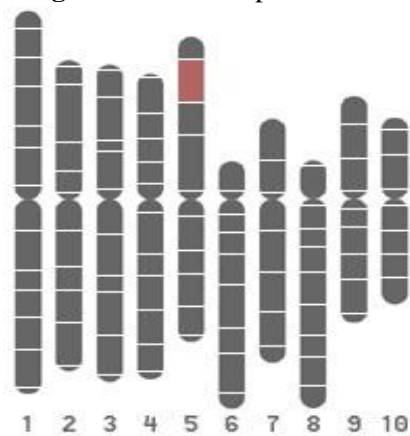
** Tm = Temperatura de anillamiento

Figura 19. Locus phi029

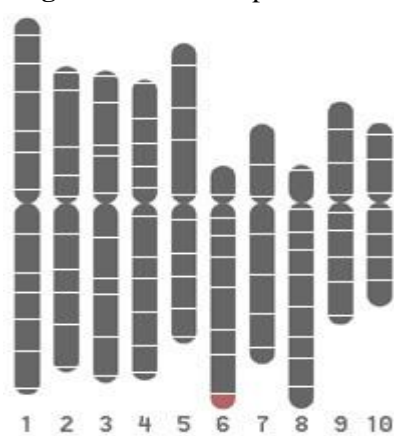
Cromosoma 3, región 4 (bin 3.04)
 Secuencia repetida: AG/AGCG

Figura 20. Locus phi093

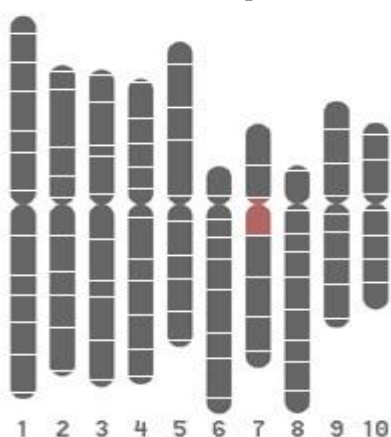
Cromosoma 4, región 8 (bin 4.08)
 Secuencia repetida: AGCT

Figura. 21 Locus phi 024

Cromosoma 5, región 1 (bin 5.01)
 Secuencia repetida: CCT

Figura 22. Locus phi089

Cromosoma 6, región 8 (bin 6.08)
 Secuencia repetida: ATGC

Figura. 23 Locus phi 034

Cromosoma 7, región 2 (bin 7.02)
 Secuencia repetida: CCT

Figura 24. Locus Umc 1061

Cromosoma 10, región 6 (bin 10.06)
 Secuencia repetida: 6(TCG)

Los tubos eppendorf con un volumen total de 15µl se introdujeron en un Termociclador (Mastercycler personal Marca Eppendorf) en los siguientes programas. (Cuadro 8)

Cuadro 8. Programa de amplificación

Paso	Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	93° C	1 minuto	1
Desnaturalización	93oC	30 segundos	
Anillamiento	X°C (Tm/2)	1 minuto	30
Extensión	72° C	1 minuto	
Extensión final	72° C	5 minutos	
Almacenamiento	4° C	Lo necesario	1

Tm/2 = Temperatura de anillamiento promedio del par de primers

Cuadro 9. Tm utilizada por cada pareja de primers en el programa de amplificación

Par de Primers	Tm °C
Phi 029 (F+R)	74
Phi 093 (F+R)	76
Phi 024 (F+R)	72
Phi 089 (F+R)	72
Phi 034 (F+R)	70
Umc 1061 (F+R)	67

* Todas las muestras amplificadas fueron almacenadas a -20° C

4.5 Carga de muestras, electroforesis y condiciones de corrida.

La electroforesis es el movimiento de partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico; las partículas con carga negativa (como el ADN) migran al ánodo las cargadas positivamente migran al cátodo. Las cargas de menor peso molecular migrarán más rápidamente al contrario de lo que pasará con las de mayor peso.

Para estimar la longitud de los fragmentos de ADN producidos por la PCR se utilizó la técnica de electroforesis vertical.

Como matriz o soporte se utilizaron geles de acrilamida/bis-acrilamida (19:1) al 6% y 1 mm de grosor ya que éstos permiten separar fragmentos de bajo peso molecular de (50 a 1000 pb) (Valdez-Moctezuma y Kahl 2000:140) y se utilizó una cámara de electroforesis vertical (16 x 14 cm) (FB-VE16-1 marca Fisher Scientific) conectada a una fuente de poder (marca E-C Apparatus Corporation, modelo EC-2060) a un voltaje de 250 volt por dos horas y 20 minutos.

Figura 25. Carga de muestras en cámara de electroforesis vertical



Acrilamida 6% (35 ml / 1 Gel)

40% Acrilamida (19:1)	5.5 ml
TG 5X*	7 ml
Dd H ₂ O	22.5 ml
APS 25%	145 µl
TEMED	18 l

En cada pozo del gel se colocó 5 µl de muestra (ADN) más 2 µl de colorante (azul de bromofenol, cuadro 23 anexos). A cada gel se agregó también ADN, empleado como control, proveniente de la línea de maíz del CYMMIT CML 292. Se emplearon 3 µl del marcador de peso molecular Sigma, φX174/ Hae III. Este marcador nos permite

aproximar el peso molecular de las bandas de las muestras que aparecen en los geles, al del marcador para facilitar su posterior análisis.

4.6 Tinción de los geles.

Para la tinción se empleó el protocolo utilizado en Laboratorio de Genética Molecular del Cimmyt. Previo a desmontar los geles de los vidrios de la cámara de electroforesis se realizó un diagrama de la colocación de las muestras. Una vez realizado el diagrama se desmontaron los geles de los vidrios y con la ayuda de una espátula se separaron de los mismos.

Estos geles se trasladaron a bandejas de plástico conteniendo 100 ml de una solución de fijación (Cuadro 24 anexo D). Las bandejas se colocaron en un agitador (maxi rotator marca Labline, modelo 4831) por 10 minutos bajo campana.

Seguidamente se elimina la solución de fijación y se agrega la solución de tinción con nitrato de plata al 2% (Cuadro 25 anexo D) por 15 minutos en agitación. Esta solución se reutilizó en al menos cinco tinciones.

La solución de nitrato de plata se lava con agua del chorro para luego agregar 150 ml de solución de revelado (NaOH 3% más 500 μ l de formaldehído (solución al 37%)), dejando agitar por 5 minutos. Nuevamente se lava el gel con agua del chorro y se deja en 100 ml de solución stopper (Cuadro 26 anexo D).

4.7 Interpretación de las bandas en los geles y análisis estadístico de los resultados.

Los alelos fueron nombrados de acuerdo al peso molecular de cada una de las bandas, que aparecieron en los geles, empleando el marcador Sigma ϕ X174/ Hae III. y tomando como base los alelos de los controles de maíz empleados por CIMMYT (CML 292) y por Ambionet, que aparecen en la página web www.cgiar.org/ambionet.

Los alelos identificados fueron nombrados, sólo si el patrón de bandas encontrado se repetía dentro de las 21 colecciones. Para evitar nombrar como alelos, bandas fantasmas, aquellas bandas que no presentaban la resolución requerida, fueron eliminadas del análisis de resultados.

Las frecuencias alélicas obtenidas fueron introducidas en el programa estadístico GeneStat-PC 3.3 (Lewis 1993), especialmente diseñado para analizar lo siguiente:

Índices de polimorfismo:

1. proporción de loci polimórficos (P)
2. heterocigosis esperada (He)

Parámetros de diversidad genética:

1. diversidad genética intrapoblacional (Hs)
2. diversidad genética total (Ht),
3. diversidad genética interpoblacional (Dst)
4. coeficiente de diferenciación genética (Gst)

A los valores medios de la heterocigosis esperada, diversidad genética total y los a niveles de polimorfismo se les corrió un análisis de varianza empleando el programa Mstat-c de Russell y Eisensnich.

Figura 26. Ejemplo de las bandas obtenidas en los geles. (Gel corrido el 10/11/04. Colección 63 amplificada con primer phi 029 (MPM= marcador Sigma ϕ X174/ Hae III)



V. RESULTADOS

5.1 Colecta del material.

No se pudo obtener 10 individuos por colección en todos los casos, debido a que en la etapa de regeneración de las colecciones, período cuando se colectaron las hojas para la extracción de ADN, algunas plantas fueron dañadas por vientos fuertes, y en otros casos presentaban daños severos, ocasionados por plagas y enfermedades, lo que no permitió su colecta. En el Cuadro 10 se presenta el número de individuos que se obtuvieron por colección.

5.2. Aislamiento y cuantificación de ADN.

Se extrajo el ADN de 190 individuos. De un peso medio de 0.020 g, se obtuvo según la cuantificación en espectrofotómetro un promedio de 462 µg/ml por muestra.

5.3. Amplificación de ADN.

Se amplificaron un total de 1140 individuos (ADN extraído de 190 individuos, y amplificado cada uno con los 6 primers utilizados). En la amplificación se utilizaron dos marcas de taq-polimerasa (Cuadros 11 y 12). La utilizada en las primeras colecciones amplificadas (Cuadro 11) fue la taq polimersa Marca Sigma, No. de Catalogo- D4545, sin embargo por falta de recursos económicos dentro del proyecto AGROCYT No. 10-02, el resto de las colecciones (Cuadro 12) fueron amplificadas con la taq-polimerasa Marca Mercury No. de catalogo 790500 que es más económica, pero que según pruebas realizadas, amplificó el ADN de solamente un 40% de las muestras evaluadas. Para emplear la taq-polimerasa Mercury se hicieron diferentes ensayos cambiando concentraciones de cloruro de magnesio y temperaturas de anillamiento en el termociclador, pero los resultados no fueron tan satisfactorios como con la taq-polimerasa de Sigma. Sin embargo, como ya se explicó, debido a la falta de recursos económicos, se tuvo que emplear la taq-polimerasa Mercury para terminar el estudio con el procedimiento descrito.

Cuadro 10. Individuos muestreados por colección

50 Colección n	Ind/colectados		Colección	Ind/colectados		Colección	Ind/colectados	
11	1	6	14	1	6	19	1	6
	2	7		2	7		2	7
	3	8		3	8		3	8
	4	9		4	9		4	9
	5	10		5	10		5	10
36	1	6	46	1	6	48	NM*	6
	2	7		2	7		2	7
	3	8		3	8		3	8
	4	9		4	9		4	9
	5	10		5	10		NM	10
56	1	6	63	1	6	72	1	6
	2	7		2	7		2	7
	3	8		3	8		3	8
	4	9		4	9		4	9
	5	10		5	10		5	10
73	1	6	74	1	6	75	1	6
	2	7		2	7		NM	7
	3	NM		3	8		NM	NM
	4	NM		4	9		NM	9
	5	NM		5	10		5	NM
76/77	76-1	76-6	79	1	6	84	1	6
	76-2	77-1		2	7		2	7
	76-3	77-2		3	8		3	8
	76-4	77-3		4	9		4	9
	76-5	77-5		5	10		5	10
106	1	6	107	1	6	---	--	--
	2	7		2	7		--	--
	3	8		3	8		--	--
	4	9		4	9		--	--
	5	10		5	10		--	--
108	1	6	109	1	6	110	1	6
	2	7		2	7		2	7
	3	8		3	8		3	8
	4	9		4	9		4	9
	5	10		5	10		5	10

*NM = no muestreado

Cuadro 11. Colecciones sometidas a PCR con Taq- polimerasa Marca Sigma

Colección	Con primer	Colección	Con primer
11	Todos los primers	63	Todos los primers
14	Todos los primers	74	Todos los primers
36	Todos los primers	79	Phi093, phi29, mc1061
46	Todos los primers	106	Todos los primers
48	Todos los primers	108	Todos los primers

Cuadro 12. Colecciones sometidas a PCR con Taq- polimerasa Mercury

Colección	Con primer	Colección	Con primer
19	Todos	77	todos
56	Todos	79	Phi024, phi034, phi089
72	Todos	84	todos
73	Todos	107	todos
75	Todos	109	todos
76	Todos	110	todos

Los mejores resultados de amplificación para ambas taq se obtuvieron con los primer Phi 093, Phi 034, Phi 029, Phi 024 y Umc 1061, mientras que con el primer Phi 089 se amplificaron el menor número de colectas (5) de las 21 estudiadas.

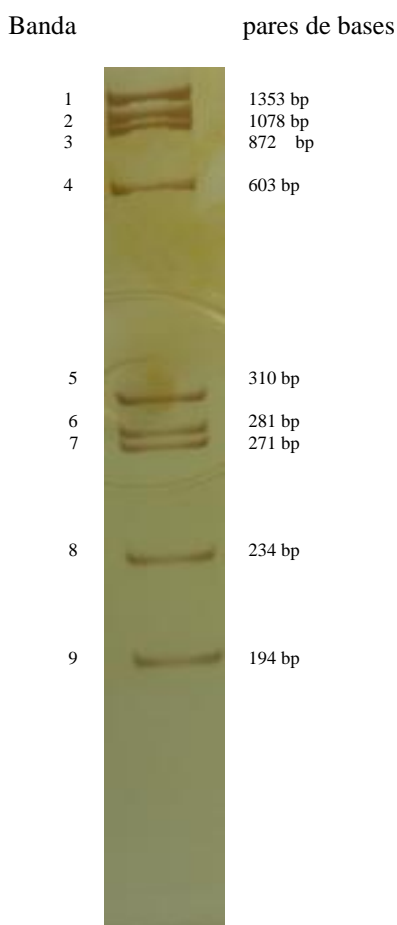
5.4. Interpretación y análisis estadístico de los resultados

5.4.1 Análisis por microsatélite (SSR). Con los primer Phi 093, Phi024, Phi 034, Phi 029, y Umc 1061, se obtuvieron bandas evaluables en la mayoría de los geles analizados (promedio de 7 de 10 individuos por colecta), la excepción fue el primer Phi 089, que mostró resultados para cinco colectas, con un total de sólo 18 individuos entre las 21 colectas analizadas.

El nombre de cada primer representa un locus dentro del cromosoma. Se obtuvo una media de 4.5 alelos por locus para los primers Phi 093, Phi 024, Phi 034, Phi 029, y Umc 1061, la excepción fue el primer 089, que presentó solamente dos alelos.

Los alelos fueron identificados con la ayuda del marcador de peso molecular Sigma, ϕ X174/ Hae III, donde a cada banda dentro de un gel le corresponde un peso molecular equivalente o aproximado al mostrado por el marcador y equivalente a los pares de bases que identifican la banda en el gel. (Figura 27). Los alelos fueron nombrados de acuerdo a los controles para maíz, provenientes del ADN de las líneas de CIMMYT (CML 292); estos controles son empleados tanto por CIMMYT como por Ambionet y aparecen en la página web www.cgiar.org/ambionet.

Figura 27. Marcador de peso molecular, mostrando las bandas y sus respectivos pesos moleculares (bp= pares de bases)



Phi 093

Con el marcador Phi093 se identificó el locus del mismo nombre y a cuatro alelos (286, 281, 275 y 271, figura 28.a y 28.b en la región ocho del cromosoma 4; constituyéndose en un locus bastante polimórfico. Este locus presentó bandas evaluables para 13 colectas de las 21 estudiadas. El alelo 271 se presentó con mayor frecuencia (en 10 colectas) de las 21 analizadas, mientras que el alelo 275 se presentó con la menor (en 5 de las 21 colecciones).

Los alelos aparecen indicados por las flechas rojas en las figuras en orden descendente (de mayor a menor peso molecular). Las dobles bandas en un gel identifican a los individuos heterocigotas, mientras que los homocigotas aparecen con sólo una banda.

Figura 28.a. Banda correspondiente al alelo 281. Colección 63, Primer Phi 093

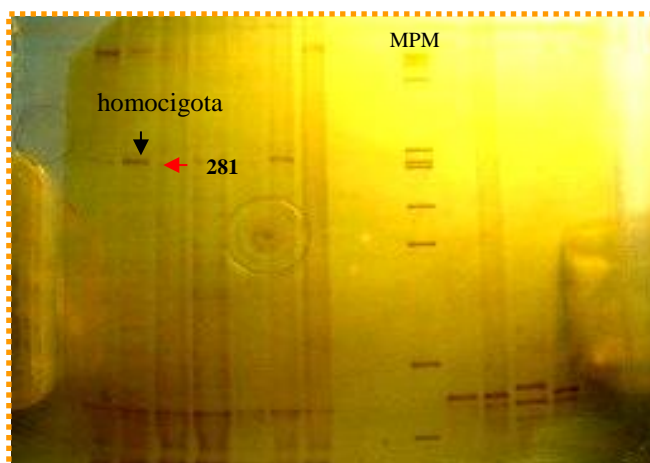
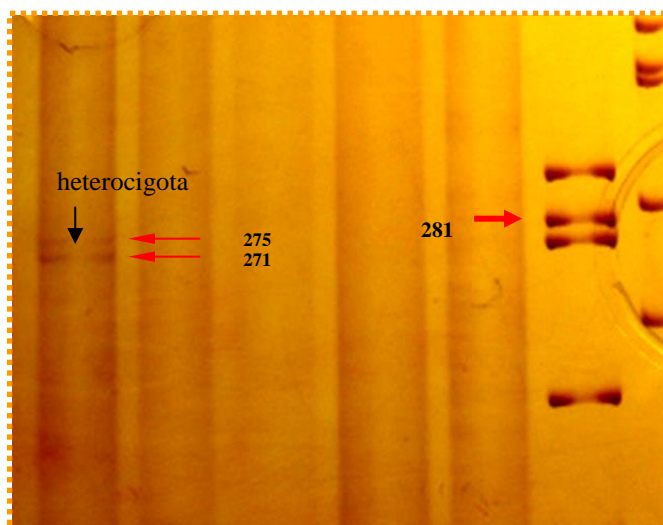


Figura 28.b. Bandas correspondientes a los alelos 275 y 271. Colección 11, Primer Phi 093

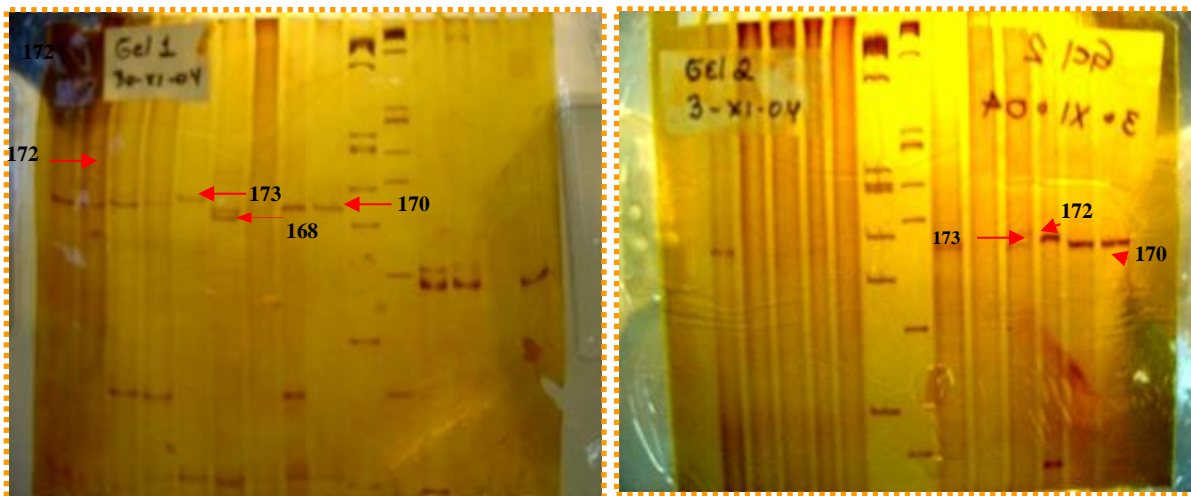


Phi 024

El locus Phi024 presentó cuatro alelos (173, 172, 170 y 168) en la región uno del cromosoma 5, es un locus polimórfico. 16 colectas de las 21 presentaron bandas evaluables. El alelo 170 se presentó con mayor frecuencia (en 14 colectas) de las 21 analizadas y el alelo 173 se presentó con la menor frecuencia (6 colectas).

Figura 29.a. Bandas correspondientes a los alelos 173, 172, 170 y 168. Colección 48, Primer Phi 024

Figura 29.b. Bandas correspondientes a los alelos 173, 172, 170. Colección 108, Primer Phi024



En la Figura 29.a. aparecen las flechas indicando la presencia de los alelos en forma descendente, la primera flecha señala al alelo 173, la segunda al 172, la tercera al 170 y la cuarta el alelo 168. En la figura 29.b. la primera flecha a la izquierda señala al alelo 173 y la primera de la derecha al alelo 172, la tercera al alelo 170.

Phi 034

El locus Phi 034 presentó igual que el locus Phi 029, el mayor número de alelos (146, 143, 137, 136, 134, 118) en la región dos del cromosoma 7, de los seis locus analizados en las 21 colecciones; ambos locus son muy polimórficos. El alelo 118 se presentó con mayor frecuencia (15 colectas) y el 143 con la menor frecuencia (3 colecciones).

Figura 30.b. Bandas correspondientes a los alelos 137, 136
Colección 108, Primer Phi 034

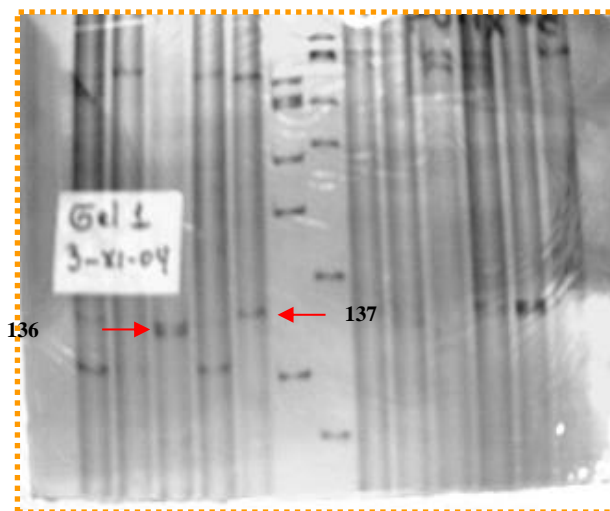
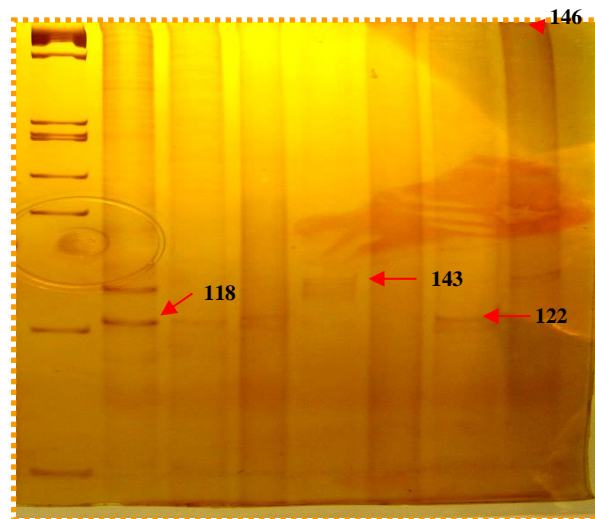


Figura 30.b. Bandas correspondientes a los alelos 146, 143, 122, 118
Colección 63, Primer Phi 034

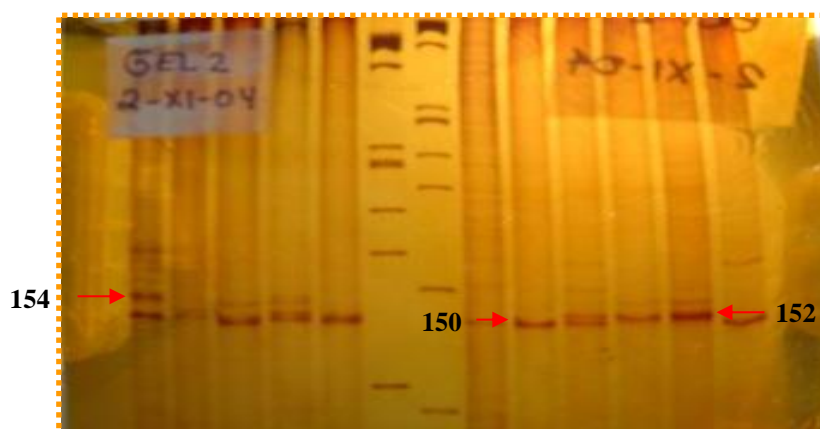


En la figura 30.a. la primera flecha a la derecha señala al alelo 146, la segunda al alelo 143, la tercera al alelo 122 y la cuarta a la izquierda el 118. En la figura 30.b. se señalan a los alelos 137 con la primera flecha y al 136 con la segunda

Phi 029

Este locus presentó seis alelos (162, 156, 154, 152, 150, 148) en la región cuatro del cromosoma 3. El alelo 150 se presentó con mayor frecuencia en un total de 13 de las 21 colectas, mientras que el alelo 156 se encontró solamente en una colecta.

Figura 31. Bandas correspondientes a los alelos 154,152,150.
Colección 108, Primer Phi 029

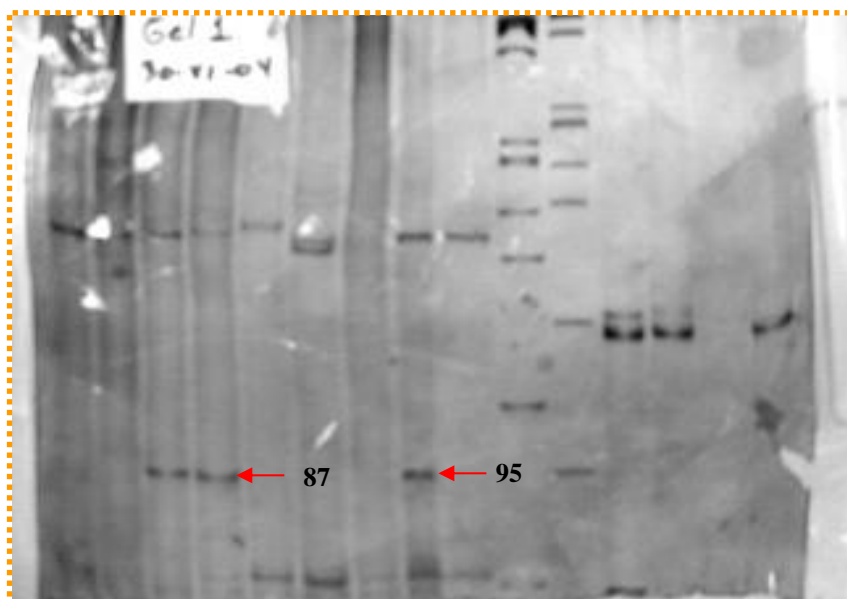


En la figura 31 la primera flecha en el lado izquierdo señala al alelo 154, la primera flecha a la derecha señala al alelo 152 y la segunda al 150.

Phi 089

Este locus fue el menos polimórfico de los seis analizados. Presentó solamente dos alelos (95 y 87) en la región ocho del cromosoma 6, y pudo ser evaluado en sólo seis colectas. El alelo 95 se presentó en las seis colectas, mientras que el 87 se identificó en solamente una.

Figura 32. Bandas correspondientes a los alelos 95 y 87.
Colección 108, Primer Phi 089

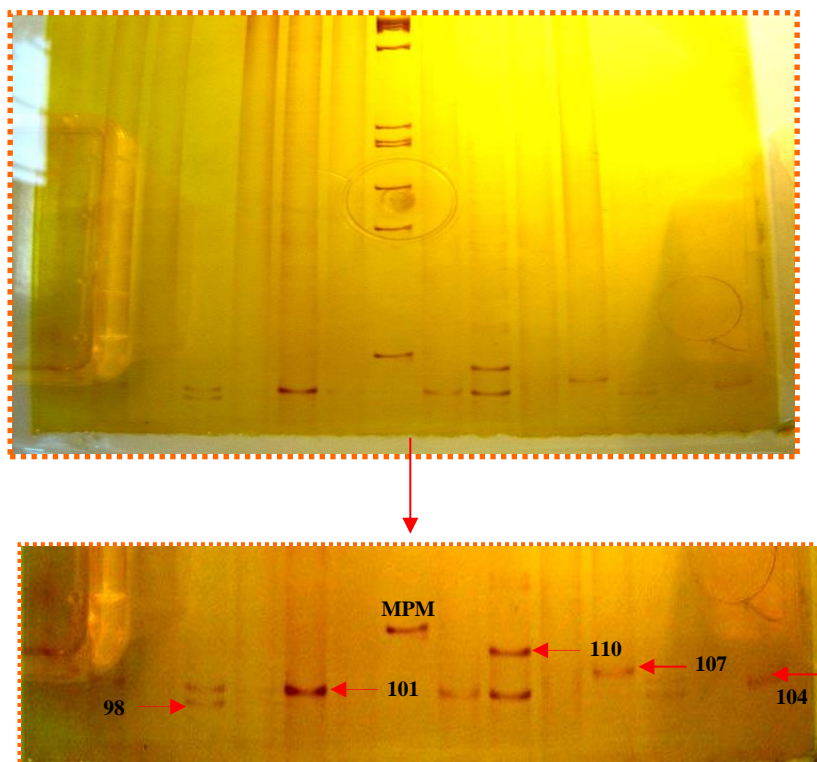


En la figura 32. la flecha superior a la derecha señala al alelo 95 y la inferior al alelo 87.

Umc 1061

En el locus Umc 1061 se identificaron cinco alelos (110, 107, 104, 101 y 98) en la región seis del cromosoma 10. Es un locus polimórfico, que presentó al alelo 104 con la mayor frecuencia de todos los alelos en todas las colectas (17 colectas) de las 21 analizadas. En este locus el alelo 110 se presentó con la menor frecuencia (3 colectas).

Figura 33. Bandas correspondientes a los alelos 110, 107, 104, 101 y 98. Colecciones 36, 46, 1, 11 y 14 según alelos señalados de izquierda a derecha con Primer Umc 1061



En la Figura 33 en el lado izquierdo la flecha superior señala al alelo 101 y la inferior al alelo 98. En el lado derecho la flecha superior señala al alelo 110, la segunda al alelo 107 y la tercera al alelo 104.

En ninguna de las 21 colecciones, empleando los seis primers anteriormente descritos se identificaron alelos raros. Los alelos raros según Alden y Loopstra (1987) se presentan en las poblaciones con una frecuencia igual o menor a 0.05. El alelo más común fue el 104 con el primer Umc 1061, que se encontró en 17 de las 21 colecciones.

5.4.2 Alelos característicos de las 21 colecciones. El Cuadro 22 muestra los alelos tipo, para cada primer, ampliamente distribuidos en las 21 colecciones. Estos alelos son los que se presentaron con mayor frecuencia en las 21 colecciones y que por lo tanto las caracterizan.

Cuadro 13. Alelos tipo ampliamente distribuidos

PRIMER	ALELO	PRESENTE EN CROMOSOMA
Phi 093	271	4
Phi 024	170	5
Phi 034	118	7
Phi 029	150	3
Phi 089	95	6
Umc 1061	104	10

5.4.3. Índices de polimorfismo El Cuadro 14 muestra los índices de polimorfismo obtenidos con el programa GeneStat-PC 3.3 (Lewis 1993) a partir de las frecuencias alélicas de cada locus (Phi 093, Phi 024, Phi 034, Phi 029, Phi 089, Umc 1061) para las 21 colecciones.

Para el valor de P = proporción de loci polimórficos, se obtuvo un valor tan alto como el de $P=100\%$ que se encontró en las colectas de Jalapa (63 y 72), Zacapa (73, 74 y 75) y Chiquimula (76 y 77), comparado con el valor medio para las especies vegetales reportado por Hamrick (1989) $P=36.8\%$. Igualmente alto $P=83\%$ se obtuvo para todas las colectas de El Progreso y de Jutiapa y para la 56 y 63 de Jalapa; así como para las colectas 79 y 84 de Chiquimula y todas las de Huehuetenango y Baja Verapaz. El valor medio de P entonces para las 21 colecciones es de 89% que juntamente con el valor medio de los alelos polimórficos por locus ($A_p=4.0$), indican altos índices de polimorfismo.

Cuadro 14. Índices de polimorfismo obtenidos para las 21 colecciones de maíz estudiadas (2003-2005)

Colectas	N	L	A	A_p	P
11 - 14 -19 -36 46 - 48 - 56	21.3333	6.0000	3.5000	4.0000	0.8333
63 -72 -73- 74 75 - 76 - 77	18.1667	6.0000	3.3333	3.3333	1.0000
79 - 84 -106 107 -108 -109 110	28.8333	6.0000	4.1667	4.8000	0.8333

N = No. de individuos por grupo

L = No. de loci analizados

A = Media de alelos por locus

A_p = Media de alelos por loci Polimórficos

P = Proporción de loci polimórficos

U = Alelos únicos

Los resultados de la diversidad genética (H_e), para facilitar su análisis, discusión y manejo dentro del texto, se separaron por grupos de siete colecciones que aparecen en los Cuadros 15, 16 y 17. Según Nei (1978) para reducir el error cuando se determina la heterocigosidad media, se debe analizar un alto número de locus, en vez de un alto número de individuos por locus. Si se desea estudiar no sólo la heterocigosidad media, sino también la distribución de las frecuencias alélicas, también debe analizarse un alto número de individuos. Los resultados obtenidos con las 21 colecciones, forman parte de un estudio más amplio que abarcará el análisis de 113 colecciones, con lo que se cumpliría lo recomendado por Nei de un alto número de individuos. Los resultados que a continuación se presentan constituyen un análisis preliminar siendo indicadores de la tendencia general de la heterocigosis.

El Cuadro 15 muestra los valores de la diversidad genética (H_e) para las colecciones 11, 14, 19, 36, 46, 48 y 56 (reportadas en el Cuadro 6). El mayor número de individuos heterocigotas se obtuvo en la colección 36 del departamento de Jutiapa, por lo que el valor de $H_e=0.59$, fue el más alto para estas siete colecciones. La colección 56 al no tener resultados mostró valores de cero para H_e . En general, los valores de H_e para estas siete colecciones fueron superiores a la media aceptada para ese parámetro en especies vegetales $H_e=0.14$ (Hamrick 1989 y Scaltsoyianess *et al.*1993), reiterando que la diversidad genética de estas siete colecciones es alta. Para estas siete colectas el mayor número de individuos heterocigotas se observó con los primer Phi093, Phi024, Phi034 y Umc 1061 en los locus del mismo nombre.

El Cuadro 16 muestra los valores de la diversidad genética (H_e) para las colecciones 63, 72, 73, 74, 75, 76 y 77. El mayor número de heterocigotas se obtuvo con la colección 77 ($H_e=0.88$), mientras que el más bajo con la 74 ($H_e=0.29$); sin embargo para ambos casos, como para el resto de las colecciones en este grupo, el valor es superior al reportado para especies vegetales $H_e=0.14$. El mayor número de heterocigotas se observó con los primer Phi 024, Phi 034 y Phi 029.

En el Cuadro 17 para las colecciones 79, 84, 106, 107, 108, 109 y 110 reportadas en el Cuadro 6, el mayor número de heterocigotas se obtuvo con la colecta 106 ($H_e=0.58$) y el más bajo con la colecta 109 ($H_e=0.24$). El mayor número de heterocigotas en este grupo se observaron con los primers Phi 093, Phi 024 y Phi 034, sin embargo como con

Cuadro 15. Diversidad genética (He) y valores de heterocigosis media para las colecciones 11 a 56

Microsatélite	Col 11	e.s.*	Col 14	e.s.	Col 19	e.s.	Col 36	e.s.	Col 46	e.s.	Col 48	e.s.	Col 56	e.s.
Phi 093	0.2585	0.1811	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.6667	0.2041	0.5306	0.1734	0.8267	0.2229	*****	*****
Phi 024	0.6079	0.2131	0.5386	0.1695	0.6667	0.2041	0.3386	0.2151	0.991	0.1208	0.7345	0.0751	*****	*****
Phi 034	0.0000	0.0000	1.3333	0.0000	*****	*****	1.0769	0.0000	0.5714	0.0945	0.6629	0.1731	*****	*****
Phi 029	*****	*****	0.5000	0.2652	*****	*****	0.6278	0.1191	0.4435	0.1106	0.1402	0.1181	0.0000	0.0000
Phi 089	*****	*****	0.0000	0.0000	*****	*****	*****	*****	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	*****	*****
Umc 1061	0.8652	0.1297	0.1991	*****	0.5714	0.0945	0.2385	0.1748	0.4388	0.1576	0.6014	0.1652	0.0000	0.0000
MEDIA	0.4329	0.1905	0.4285	0.2046	0.4127	0.2082	0.5897	0.1748	0.3640	0.0898	0.4943	0.1388	0.0000	0.0000

*e.s = Error Standard

Cuadro 16. Diversidad genética (He) y valores de heterocigosis media para las colecciones 63 a 77.

Microsatélite	Col 63	e.s.*	Col 72	e.s.	Col 73	e.s.	Col 74	e.s.	Col 75	e.s.	Col 76	e.s.	Col 77	e.s.
Phi 093	0.3079	0.1473	*****	*****	0.3556	0.1591	0.0000	0.0000	*****	*****	0.3556	0.1591	*****	*****
Phi 024	*****	*****	*****	*****	0.0000	0.0000	0.5702	0.1133	0.3556	0.1591	0.4457	0.1643	1.0000	0.5000
Phi 034	0.7346	0.1552	0.6470	0.813	*****	*****	0.7474	0.0544	0.6000	0.1291	0.7499	0.1391	0.7499	0.0966
Phi 029	0.5385	0.1213	*****	*****	1.0000	0.5000	0.4752	0.0801	0.5000	0.2652	1.0000	0.5000	*****	*****
Phi 089	*****	*****	*****	*****	0.5714	0.0945	0.0000	0.0000	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Umc 1061	0.5333	0.0947	0.4388	0.1576	*****	*****	0.0000	0.0000	-0.0128	*****	*****	*****	*****	*****
MEDIA	0.5286	0.0872	0.5429	0.1041	0.4817	0.2091	0.2988	0.1383	0.3607	0.1342	0.6378	0.1473	0.8750	0.1250

Cuadro 17. Diversidad genética (He) y valores de heterocigosis media para las colectas de 79 a 110 según cuadro 6.

Microsatélite	Col 79	e.s.*	Col 84	e.s.	Col 106	e.s.	Col 107	e.s.	Col 108	e.s.	Col 109	e.s.	Col 110	e.s.
Phi 093	0.000 0	0.000 0	0.799 9	0.121 8	0.799 9	0.121 8	0.688 9	0.103 8	0.708 9	0.090 8	*****	*****	0.571 4	0.094 5
Phi 024	*****	*****	0.799 9	0.172 1	0.200 0	0.154 1	0.000 0	0.000 0	0.770 8	0.068 9	*****	*****	0.000 0	0.000 0
Phi 034	0.800 0	0.088 8	0.595 9	0.103 0	0.749 9	0.139 1	0.869 3	0.128 0	0.832 0	0.039 7	*****	*****	0.690 7	0.939
Phi 029	0.585 0	0.145 3	0.000 0	0.000 0	0.496 2	0.086 6	0.734 6	0.155 2	0.684 2	0.063 6	*****	*****	0.538 5	0.121 3
Phi 089	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	0.000 0	0.000 0	*****	*****	*****	*****
Umc 1061	0.328 3	0.124 8	0.100 6	0.098 2	0.673 7	0.098 3	0.160 6	0.132 8	0.383 7	0.129 0	0.259 3	0.135 9	0.378 4	0.149 7
MEDIA	0.428 3	0.172 3	0.459 3	0.171 8	0.584 0	0.108 9	0.490 7	0.172 0	0.563 3	0.129 2	0.259 3	*****	0.435 8	0.119 8

el resto de colecciones de los dos grupos anteriores, los valores de He para las 20 colecciones, excepto la colecta 56, son superiores a la media aceptada para ese parámetro en especies vegetales $H_e=0.14$, indicando una alta diversidad genética para las colecciones de los Departamentos de El Progreso, Jutiapa, Jalapa (exceptuando la colecta 56), Zacapa, Chiquimula, Huehuetenango y Baja Verapaz.

Por el alto número de heterocigotos presentes en las colecciones 108, 77 y 36, son altamente recomendables para formar parte de una colección núcleo.

Los valores medios de la heterocigosidad esperada para todas las colecciones, no mostraron diferencias significativas al 5% después de un análisis de varianza.

5.4.4 Parámetros de diversidad genética.

Al igual que para los índices de polimorfismo, los resultados de los parámetros de diversidad genética se presentan en los Cuadros 18, 19 y 20 para facilitar su manejo, análisis y discusión.

El Cuadro 18 muestra los parámetros de diversidad genética para las colecciones 11, 14, 19, 36, 46, 48 y 56.

Cuadro 18. Parámetros de diversidad genética estudiados para 6 microsatélites en las colecciones 11 a la 56.

Microsatélite	Hs	Js	Ht	Jt	Dst	Gst
Phi 093	0.3938	0.6062	0.7172	0.2828	0.3235	0.4510
Phi 024	0.5088	0.4912	0.7590	0.2410	0.2502	0.3296
Phi 034	0.7227	0.2773	0.8565	0.1435	0.1339	0.1563
Phi 029	0.3374	0.6626	0.3503	0.6497	0.0129	0.0368
Phi 089	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	*****
Umc 1061	0.4404	0.5596	0.5738	0.4262	0.1334	0.2325
MEDIA	0.4005	0.5995	0.5428	0.4572	0.1423	0.2621
s.e.	0.0969	0.0969	0.1302	0.1302	*****	*****

Hs: diversidad genética intrapoblacional, **Js:** identidad genética intrapoblacional, **Ht:** diversidad genética total, **Jt:** identidad genética total, **Dst:** diversidad genética interpoblacional, **Gst:** coeficiente de diferenciación entre poblaciones

El valor medio de la diversidad genética total para este grupo de colecciones fue de $H_t=0.54$. Según Yao (1993) valores de H_t superiores a 0.40 se pueden considerar muy altos. El valor más alto ($H_t=0.85$) se obtuvo con el primer Phi 034, uno de los más polimórficos y el más bajo $H_t=0.0$ con el primer Phi 089.

El valor medio de la diversidad genética intrapoblacional $H_s=0.40$ (en nuestro caso dentro de las colecciones) fue superior al observado para la diversidad genética interpoblacional $D_{st}=0.14$ (entre colecciones), indicando que la diversidad genética de estas siete colecciones es alta y mayor dentro de las colecciones, que entre las colecciones.

El Cuadro 19 muestra los parámetros de diversidad genética de las colecciones 63, 72, 73, 74, 75, 76 y 77.

Cuadro 19. Parámetros de diversidad genética estudiados para 6 microsatélites en las colecciones 63 a la 77.

Microsatélite	Hs	Js	Ht	Jt	Dst	Gst
Phi 093	0.2867	0.7133	0.6739	0.3261	0.3872	0.5746
Phi 024	0.4244	0.5756	0.4271	0.5729	0.0027	0.0063
Phi 034	0.7054	0.2946	0.7274	.2726	0.0220	0.0303
Phi 029	0.6430	0.3570	0.6855	0.3145	0.0425	0.0620
Phi 089	0.3636	0.6364	0.4318	0.5682	0.0682	0.1579
Umc 1061	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	*****
MEDIA	0.4039	0.5961	0.4910	0.5090	0.0871	0.1774
s.e.	0.1044	0.1044	0.1119	0.1119	*****	*****

Hs: diversidad genética intrapoblacional, **Js:** identidad genética intrapoblacional, **Ht:** diversidad genética total, **Jt:** identidad genética total, **Dst:** diversidad genética interpoblacional, **Gst:** coeficiente de diferenciación entre poblaciones

Para estas siete colecciones, la diversidad genética total $H_t=0.49$ fue inferior a la del grupo anterior de colecciones, sin embargo sigue siendo alta. El valor más alto de $H_t=0.72$ se obtuvo también con el primer Phi 034, como en el grupo anterior, pero el más bajo $H_t=0.0$ con el primer Umc 1061. Para este grupo también el valor medio de la diversidad genética intrapoblacional $H_s=0.40$ es muy superior al valor medio de la diversidad genética interpoblacional $D_{st}=0.087$, que confirma que la alta diversidad genética de estas siete colecciones está contenida dentro de las colecciones y no entre colecciones.

Cuadro 20. Parámetros de diversidad genética estudiados para 6 microsatélites en las colecciones a 79 a la 110.

Microsatélite	Hs	Js	Ht	Jt	Dst	Gst
Phi 093	0.5887	0.4113	0.7436	0.2564	0.1546	0.2083
Phi 024	0.3564	0.6436	0.5981	0.4019	0.2417	0.4042
Phi 034	0.7547	0.2453	0.7604	0.2396	0.0057	0.0075
Phi 029	0.5458	0.4542	0.6246	0.3754	0.0788	0.1262
Phi 089	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	*****
Umc 1061	0.3274	0.6726	0.6265	0.3735	0.2991	0.4774
MEDIA	0.4288	0.5712	0.5589	0.4411	0.1301	0.2327
s.e.	0.1072	0.1072	0.151	0.1151	*****	*****

Hs: diversidad genética intrapoblacional, **Js:** identidad genética intrapoblacional, **Ht:** diversidad genética total, **Jt:** identidad genética total, **Dst:** diversidad genética interpoblacional, **Gst:** coeficiente de diferenciación entre poblaciones

El Cuadro 20 presenta los parámetros de diversidad genética del último grupo de colecciones 79, 84, 106, 107, 108 y 110.

El valor medio de la diversidad genética total $Ht=0.56$ para estas siete colecciones es también alto, como lo es el valor medio de la diversidad genética intrapoblacional $Hs=0.4288$, en comparación con el bajo valor medio de la diversidad genética interpoblacional $Dst=0.13$. Al igual que para los grupos anteriores Phi 034 reportó la Ht más alta (0.76) y Phi 089 la más baja $Ht=0$.

El promedio de los valores medios de la diversidad genética total $Ht=0.53$ y de la diversidad genética intrapoblacional $Hs=0.41$ en las 21 colecciones es superior al valor promedio de los valores medios de la diversidad genética interpoblacional $Dst=0.12$, reiterando que la alta diversidad genética de las 21 colecciones está contenida dentro de cada colecta y no entre las colecciones.

Los valores medios de la diversidad genética total no mostraron una diferencia significativa al 5% entre las 21 colecciones, sugiriendo una distribución homogénea en la frecuencia de aparición de los alelos identificados dentro de las colecciones estudiadas.

El Cuadro 21 muestra las identidades genéticas obtenidas con el análisis de las distancias genéticas de Nei y donde valores cercanos a uno, representan la identidad genética. Para el análisis las 21 colecciones fueron divididas en grupos de tres. Las colectas de las filas en la izquierda se comparan con las colectas en las columnas a la

derecha. Valores de 1.0 se obtienen cuando se comparan con ellas mismas o dependiendo de los resultados, con otras colectas.

Cuadro 21. Identidades genéticas para las 21 colecciones estudiadas

Colecciones	Col. 11-56	Col. 63-77	Col. 79-110
Col. 11-56	1.0	0.7863	0.9659
Col. 63-77		1.0	0.8291
Col. 79-110			1.0

El análisis preliminar de las distancias genéticas de Nei, sugiere que aunque no parece haber diferencias significativas en cuanto a la distribución de los alelos en las 21 colecciones, genéticamente las colectas correspondientes a los Departamentos de Chiquimula (79 y 84), Huehuetenango (106 y 107), Baja Verapaz (108, 109 y 110), parecen estar más cercanas (identidad genética = 0.97) a las colectas de los departamentos de El Progreso (11, 14, 19), Jutiapa (36, 46, 48) y Jalapa (56), que a las colectas de los departamentos de Jalapa (63, 72), Zacapa (73, 74, 75) y la 76 de Chiquimula. Para confirmar la posible formación de grupos entre las 21 colecciones genéticamente distantes unos de otros, con los seis primers empleados, se necesitan los resultados de un mayor número de individuos y colecciones.

VI. DISCUSIÓN

6.1 Amplificación de ADN con la reacción en cadena de la polimerasa, PCR

El promedio de individuos analizados por colección que presentaron resultados evaluables fue de 5 individuos, la excepción fue la colecta 108, con la que se consiguieron resultados evaluables para 7-10 individuos. Estos resultados sugieren que el ADN de la colecta 108, bien podría emplearse como control dentro de los geles en estudios similares, tal como se emplea el control del ADN de las líneas de CIMMYT (CML 292).

El promedio de individuos que presentaron bandas evaluables por colección sobre los geles, podría aumentarse optimizando aún más las condiciones de la PCR y así lograr que un mayor número de fragmentos del ADN amplifique con cada primer empleado. Aunque para este estudio se empleó la metodología del Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT (1998) para amplificar ADN por la reacción en cadena de la polimerasa, el cambio de taq-polimerasa marca Sigma a la marca Mercury influyó en los resultados obtenidos y en el número de individuos que presentaron bandas evaluables, como se hizo constar en los resultados.

6.2 Análisis de los microsatélites

Las bandas evaluables en la mayoría de los geles (promedio de 7 individuos de 10 por colecta) obtenidas con los primer Phi 093, Phi 024, Phi 034, Phi 029 y Umc 1061, permitieron identificarlos como aptos para estudios de diversidad genética para germoplasma de maíz de las zonas secas de Guatemala, la excepción fue el primer Phi089, que al mostrar bajos resultados de amplificación (sólo 18 individuos para el total de las 21 colecciones), no es recomendable para este tipo de estudios.

Los seis primer empleados permitieron además, identificar a los alelos que se presentaron con la mayor frecuencia dentro de las 21 colecciones, y que por lo tanto las caracterizan. El alelo 104 identificado en el locus Umc 1061 del cromosoma 10 fue el más común para las 21 colecciones. La identificación de alelos es importante, no sólo

para caracterizar las colecciones, sino también para conocer su ubicación en los cromosomas. Estudios más avanzados, con el empleo de marcadores moleculares, han permitido identificar QTL (locus con rasgos cuantitativos continuos) en regiones específicas de los cromosomas y relacionar a alelos específicos con estas regiones. Dentro de estos estudios se citan los del análisis de la diversidad genética de la tolerancia a sequía de maíz, empleando marcadores moleculares (Sari-Gorla *et al.* 1999) y los de Ribout *et al.* (1996 y 1997). En estos estudios se identificaron a los cromosomas 1, 2, 4, 5, 7, 8 y 9 como directamente relacionados a la expresión del intervalo ASI (intervalo entre la floración masculina y femenina) en maíz y directamente relacionado a la tolerancia a sequía.

Con este trabajo se obtuvo información para los alelos de los cromosomas 4, 5 y 7, también relacionados con la expresión del intervalo ASI, importante para la selección de germoplasma nativo a emplearse en la generación de nuevas variedades tolerantes a sequía.

En ninguna de las 21 colecciones, empleando los seis primers anteriormente descritos se identificaron alelos raros. Los alelos raros según Alden y Loopstra (1987) se presentan en las poblaciones con una frecuencia igual o menor a 0.05. La optimización en las reacciones de PCR, incluyendo el empleo de la mejor taq polimerasa para amplificar el mayor número de regiones microsatélites en el ADN de maíz, que no fue posible en este estudio, por razones económicas, aumentaría el número de individuos por colecta con resultados evaluables, para hacer el análisis de las frecuencias alélicas y así poder detectar posibles alelos raros.

La posibilidad de alelos raros no detectados es un hallazgo muy importante cuando se quiere conservar la diversidad genética de los recursos fitogenéticos en bancos de germoplasma, ya que el ideal es el de conservar la mayor variabilidad genética contenida en las colecciones y ésta debe incluir tanto alelos tipo o comunes ampliamente distribuidos, localmente distribuidos, así como alelos raros. El hallazgo es importante también para el programa de mejoramiento de maíz del ICTA, ya que para ampliar la base genética, con el objetivo de obtener nuevas variedades, es esencial partir de la mayor variabilidad genética posible, por lo que al completar el proyecto, habrá que concluir sobre la metodología de colecta o una posible erosión genética.

6.3 Diversidad genética de las 21 colecciones:

6.3.1 Índices de polimorfismo Los resultados obtenidos con los índices de polimorfismo y los parámetros de diversidad genética permitieron analizar la diversidad genética presente en las 21 colecciones.

Para los índices de polimorfismo, se considera que un locus es polimórfico, cuando la frecuencia del alelo más común es igual o menor que 99%.

El valor medio de la proporción de loci polimórficos, obtenido a partir del número de alelos por locus, $P=89\%$ y de $A_p=4$ (media de alelos por loci polimórfico) en las 21 colecciones, al compararse con los mismos valores medios aceptados para estos índices en las especies vegetales ($P=36.8\%$, $A_p=1.7$), reportados por Hamrick (1989), indican un alto índice de polimorfismo. Se obtuvo una media de 4.5 alelos por locus similar a los 4.9 reportados por Warburton (2002) con líneas híbridas y por Lu y Bernardo (2001), empleando híbridos de maíz y marcadores microsatélites para su análisis genético.

En cuanto al índice de diversidad genética (H_e), el concepto de diversidad genética en base a la riqueza alélica de Brown y Weir (1983) dice que una muestra con tres alelos de la misma frecuencia tiene más diversidad que una con un solo alelo predominante y dos raros. Este concepto apoya la riqueza alélica encontrada en las colectas estudiadas con un valor alto de P , que indica una alta diversidad genética para las 21 colecciones estudiadas.

Como se mencionó anteriormente, el análisis de las frecuencias alélicas no evidenció la presencia de alelos raros en ninguna de las 21 colecciones. Brown y Marshall (1995) catalogan los alelos en alelos raros, alelos tipo, o comunes; ampliamente distribuidos y los comunes, localmente distribuidos. La presencia de estos tipos de alelos en las colecciones son indicadores de muestreos representativos de la diversidad genética de las poblaciones estudiadas. Este resultado como se mencionó evidencia la necesidad de optimizar el método de amplificación para obtener resultados analizables de un mayor número de individuos y de extender también el estudio a un mayor número de colecciones para concluir, como se mencionó, respecto del muestreo o posible erosión genética.

Al igual que para el alto valor medio de la proporción de loci polimórficos $P=89\%$ en las 21 colecciones, los valores de la diversidad genética (H_e) obtenidos (Cuadros 15, 16 y 17) fueron altos para todas las colectas, superando los valores reportados para especies vegetales por Hamrick ($H_e=0.14$) la colección 56 fue la excepción ya que no presentó individuos heterocigotos. Ambos índices de polimorfismos indican una alta diversidad genética y una alta presencia de heterocigotos para 20 colecciones. La presencia de un alto número de heterocigotas es muy importante para asegurar los procesos evolutivos de el maíz nativo de Guatemala.

Una alta presencia de heterocigotos sugiere un buen flujo de genes, que es muy importante para mantener la viabilidad del germoplasma de maíz nativo para los agricultores y puede considerarse como una herramienta de reparación para el germoplasma nativo que ha acumulado mutaciones, como lo sugieren Berthaud, *et al.* (2002).

Los valores medios de la heterocigosidad esperada para todas las colecciones, no mostraron diferencias significativas al 5% después de un análisis de varianza. Estos resultados, junto a las frecuencias alélicas obtenidas, sugieren una distribución homogénea de los alelos en los siete departamentos estudiados.

6.3.2 Parámetros de diversidad genética. Los parámetros de diversidad

genética: diversidad genética intrapoblacional (H_s), identidad genética intrapoblacional (J_s), diversidad genética total H_t , identidad genética total (J_t), diversidad genética interpoblacional (D_{st}), coeficiente de diferenciación entre poblaciones (G_{st}) permitieron medir la variación dentro y entre las colecciones estudiadas, así como conocer su distribución cuando se compara entre colecciones. En este estudio los parámetros que aplican a poblaciones, como en el caso de H_s representan la diversidad genética entre las 21 colecciones.

Según Yao (1993) valores de H_t superiores a 0.40 se pueden considerar muy altos. El promedio de los valores medios de la diversidad genética total $H_t=0.53$ en las 21 colecciones indican una diversidad genética alta para el maíz de las zonas secas de Guatemala. Esta alta diversidad genética es superior al valor promedio de los valores medios de la diversidad genética intrapoblacional $H_s=0.41$. El bajo valor promedio de la diversidad genética interpoblacional $D_{st}=0.12$ indican que 99.8% de la diversidad

genética total está contenido dentro de las colectas y que sólo 2% de diversidad genética las separa, según lo obtenido con $G_{st}=0.2$ (coeficiente de diferenciación entre poblaciones) para las 21 colecciones.

Los valores medios de la diversidad genética total no mostraron una diferencia significativa al 5% entre las 21 colecciones, sugiriendo una distribución homogénea en la frecuencia de aparición de los alelos identificados dentro de las colecciones estudiadas. Este resultado reitera que la diversidad genética está contenida dentro de las colecciones y no es mayor entre éstas.

El análisis preliminar de las distancias genéticas de Nei, sugiere una posible formación de grupos entre las 21 colecciones. Estos resultados sugieren que las colecciones correspondientes a los Departamentos de Chiquimula (79 y 84), Huehuetenango (106 y 107), Baja Verapaz (108, 109 y 110), parecen estar más cercanas (identidad genética, $I = 0.97$) a las colectas de los departamentos de El Progreso (11, 14, 19), Jutiapa (36, 46, 48) y Jalapa (56), que a las colectas de los departamentos de Jalapa (63, 72), Zacapa (73, 74, 75) y la 76 de Chiquimula ($I=0.79$). Para confirmar la posible formación de grupos entre las colecciones que fueran genéticamente distantes unos de otros, con los seis primers empleados, se necesitan los resultados de un mayor número de individuos y colecciones.

Los resultados obtenidos permitieron el cumplimiento de los objetivos presentados, ya que se logró determinar la diversidad genética de las 21 colecciones y se identificaron los alelos que las caracterizan, generando información que será empleada por el Banco de Germoplasma del ICTA para planificar mejorar la conservación y la posible conformación de colecciones núcleo de germoplasma de maíz.

Para finalizar es importante mencionar que estos resultados son los primeros que existen sobre el tema en Guatemala y forman parte de la contribución del ICTA para establecer una plataforma de elementos clave ante la posible autorización de entrada de maíz transgénico al país.

Los resultados de esta caracterización molecular se emplearán posteriormente en el proyecto AGROCYT No.10-02 para establecer correlaciones con los caracteres

morfológicos de las 21 colecciones, para posteriormente generar nuevas variedades de maíz tolerantes a sequía.

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los primer Phi 093, Phi 024, Phi 034, Phi 029, y Umc 1061 permitieron obtener fragmentos de ADN evaluables para estudios de diversidad genética, por lo que son altamente recomendables para emplearse en la caracterización de germoplasma de maíz nativo de las zonas secas de Guatemala. Por el contrario el primer Phi 089, no es recomendable para este tipo de estudios.

El ADN de la colecta 108, podría emplearse como ADN control en los geles que empleen marcadores microsatélites para el estudio genético del maíz de Guatemala.

Se determinó una alta diversidad genética en el maíz nativo de los Departamentos de El Progreso, Jutiapa, Jalapa, Zacapa, Chiquimula, Huehuetenango y Baja Verapaz indicada a través un alto valor medio del los índices de polimorfismo para las 21 colecciones, $P=89\%$ y $A_p=4.0$ y resultando superior a los reportados por Hamrick (1989) ($P=36.8\%$, $A_p=1.7$) para las especies vegetales en general.

Las colectas 36, 77 y 108 reportaron los valores medios de la heterocigosis más altos ($H_e=0.58$, 0.87 y 0.53 respectivamente), indicando un alto número de individuos heterocigotas que pudieran asegurar la continuación de los procesos evolutivos del maíz nativo de Guatemala y reiteran la presencia de una alta diversidad genética para las 21 colecciones estudiadas.

Las colecciones 36 del Departamento de Jutiapa, 77 del Departamento de Chiquimula y 108 del Departamento de Baja Verapaz, por su alto de número de heterocigotas deben formar parte de una posible colección núcleo.

El alto valor promedio de la diversidad genética total $H_t=0.53$ y el de la diversidad genética intrapoblacional $H_s=0.41$, junto a un bajo valor promedio de la diversidad genética interpoblacional $D_{st}=0.12$ indican que 99.8% de la diversidad genética total para las 21 colecciones está contenida dentro de las colecciones.

Los resultados obtenidos con este estudio permitieron alcanzar los objetivos presentados, al determinar la diversidad genética del maíz de las zonas secas de Guatemala y su distribución entre las 21 colecciones, así como la identificación de los alelos que las caracterizan.

Estos resultados se emplearán posteriormente en el proyecto AGROCYT NO.10-02 para establecer correlaciones con los caracteres morfológicos de las 21 colecciones evaluadas, generando información básica de gran utilidad para el mejoramiento del cultivo, enfocado a reducir la pérdida de rendimiento debido a las condiciones de humedad limitada.

La información obtenida a través de esta caracterización molecular y su utilización adecuada por el Banco de Germoplasma del ICTA, contribuirá a conservar los recursos fitogenéticos de maíz de Guatemala, ampliar su base genética y complementar la información necesaria para la conformación de colecciones núcleo de este cultivo.

Al incrementar la producción de este grano, a través de los programas de mejoramiento de maíz y su conservación adecuada, se asegura la provisión de alimento en forma local. Provocando un impacto en la seguridad alimentaria nacional y contribuyendo con el compromiso adquirido a través del Convenio de la Diversidad Biológica, que nos responsabiliza como país a la conservación y protección de la misma. Por lo que se recomienda ampliar la información obtenida a través de este estudio e integrar los resultados en planes y programas que permitan una utilización sostenible de este recurso que es de tanta importancia para Guatemala.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, José Luis. 2002. *Guatemala, centro de origen y desarrollo del maíz*. Pastoral de la Tierra Interdiocesana. Guatemala, Guatemala. 8pp.
- Alden, J. y C. Loopstra. 1987. *Genetic diversity and population structure of Picea glauca on an altitudinal gradient in interior Alaska*. Can. J. Ro. Res. 17: 1519-1526.
- Aldrich, S.R. y E.R Leng. 1974. *Producción moderna de maíz*. Argentina, Editorial Hemisferio Sur. 307pp.
- Aranguren, J. y J. Jordana. 2003. *Utilización de marcadores de ADN (microsatélites) en poblaciones de animales domésticos en peligro de extinción*. Universidad Autónoma de Barcelona.
http://cecalc.ula.ve/AVPA/ariculos_libres/AVPAconservaciónpdf (2004).
- Azurdia, César. 1999. *Usando los recursos genéticos: Un acercamiento al acceso y tecnología*. Estrategia Nacional para la conservación y usos sostenible de la biodiversidad –Guatemala-. Guatemala, Comisión Nacional del Medio Ambiente (CONAMA). 89 pp.
- Azurdia, César. 2004. *Priorización de la diversidad biológica de Guatemala en riesgo potencial por la introducción y manipulación de organismos vivos modificados*. Documento técnico No. 14 (03-2004), Presidencia de la República. Guatemala, Guatemala, Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP). 108 pp.
- Baena, Margarita, et. al. 2003. *Material de apoyo a la capacitación en conservación in situ de la diversidad vegetal en áreas protegidas y en fincas*. IPGRI (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Alimentaria. INIA, España 130pp.
- Becerra, V. y M. Paredes. 1999. *Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética*. Agricultura Técnica. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. 60 (3): 270-281. INIA. Chile.
- Berthaud, J., G. Pressoir, F. Ramírez-Corona y M. Bellon. 2002. *Farmers management of maize landrace diversity. A case study in Oaxaca and beyond*. CIMMYT. México D.F. 8pp.
- Bolaños, J. y G. Edmeades. 1988. *The importance of the anthesis-silkin interval in breeding for drought tolerance in tropical maize*. En: Agronomy Abstract. ASA, Anaheim. CA. 75pp.

- Bolaños, J.; G. Edmeades y L. Martínez. 1993. *Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. III Responses in drought-adaptive physiological and morphological traits*. Field Crops Res. 31:269-286.
- Bolaños, J. y G. Edmeades. 1997. *The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize*. En: G. O. Edmeades, M. Banziger, H. R. Mickelson, and C. B. Peña-Valdivia (eds.) *Developing Drought and Low-N Tolerant Maize*. Proceedings of a Symposium. Marzo 25-29, 1996. CIMMYT. El Batán, D.F. México. 355-368pp.
- Brown, A.H.D., D. R. Marshall. 1995. *A basic sampling strategy: theory and practice*. In: *Collecting Plant Genetic Diversity*. (Ed.) L. Guarino, V. Ramanatha Rao and R. Reid. pp 75-91. International Plant Genetic Resources Institute-IPGRI. Rome.
- Castañeda, César; O. Castañeda y S. Gramajo. *Importancia de la Biodeiversidad en el desarrollo de la sociedad Guatemalteca*. II foro, Xelajú 2000 <http://usuarios.lycos.es/xelaju/biogua1.htm>
- Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) *Coordinación de la Unidad de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología*. 2004. Costa Rica
- Christiansen M. N y C. F. Lewis.1987. *Mejoramiento de plantas en ambientes poco favorables*. México, Editorial Limusa, S.A de C.V. 528 pp.
- Molecular data analyses and applications*. 1996. CIMMYT. México, D.F. 76 pp.
- Applied Molecular Genetics Laboratory*. 1998. Centro Internacional de mejoramiento de maíz y trigo (CIMMYT), Laboratory Protocols. México. 65 pp.
- Draft consensus document on biology of Zea mays subsp. mays (maize)*. 2001. CIMMYT, México, D.F. 57 pp.
- Escenario Climático para Guatemala*, 2000. Comisión Nacional De Medio Ambiente, Guatemala. 27 pp.
- Dardón, Danilo. 1980. *Evaluación, caracterización y herencia de la punta descubierta en genotipos tropicales de maíz (Zea mays L.)* Tesis Universidad San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. Guatemala, Guatemala 66pp.
- Doyle, J. y J. Doyle. 1990. *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. Focus 12: 13-15.

- Entrala, Carmen. 2000. *Técnicas de análisis del ADN en genética forense*. Laboratorio de ADN de forense. Depto. de Medicina Legal. Universidad de Granada España. fai.unne.edu.ar/bioetica/forensetec.htm. (2004)
- FAO. 1996a. *Conservación y utilización sostenible de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 10pp
- FAO. 1996b. *Informe sobre el estado de los recursos fitogenéticos en el mundo*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia 75pp.
- FAO. 1996c. *Plan de acción mundial para la conservación y la utilización sostenible de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 64 pp.
- FAO/IPGRI. 1994. *Genebank standards*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia. International Plant Genetic Resources Institute, Roma, Italia.
- Fernández J, B. Villanueva y M. A. Toro. 2004. *Eficiencia del uso de marcadores moleculares en programas de conservación*. Departamento de Mejora Genética Animal. INIA. Madrid y Scottish Agricultural College, Edimburgo, Reino Unido. 6pp.
- Frankel, O. H. y J.G. Hawkes. 1975. *Crop genetic resources for today and tomorrow*. IBS series Vol 2. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Ford-Lloyd, B. y M. Jackson 1986. *Plant genetic Resources, and introduction to their conservation and use*. Edward Arnold. Londres 24pp.
- Fuentes, Mario Roberto. 1995. *Desarrollo del germoplasma de maíz para el altiplano de Guatemala*. En: La XVI Reunión Andina, Bolivia. 16pp.
- Fuentes, M. R. y W. Quemé. 2002. *Evaluación de híbridos de maíz de grano amarillo y blanco en diferentes ambientes de Latinoamérica*. Informe ensayo regional de maíz PCCMCA 2000. Guatemala. 63 pp.
- Maize. GDB. 2004. *The maize genome is BIG*. En: Maize genetics and genomics data base. <http://www.maizegdb.org/documentation/mgdp/education/challenge.php> (2004)
- Gresshoff, P.M. 1992. *Plant Biotechnology and Development*. CRC Press, Inc, Boca Ratón, Florida. 171pp.

- Hammer, K.; A. Piederichsen y M. Spahillari. 1993. *Proceedings of the technical meeting on the methodology of the FAO world information and early warnings system on plant genetic resources*. Research Institute of crop production. Praga, República Checa, 29-33pp
- Hamrick, J. 1989. *Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations*. En: *Isozymes in plant biology*. D. E. Soltis and P. S. Soltis. Ed. Dioscorides Press. Portland, Oregon. 87-105pp.
- Heidrich-Sobrinho, E. y A. R. Cordeiro. 1975. *Codominant isoenzymic alleles as markers of genetic diversity correlated with heterosis in maize (Zea mays)*. *Theory Applied Genetics*. 46:197-199
- INSIVUMEH. 1984. *Análisis de la estación lluviosa de Guatemala con fines agrícolas*. Ministerio de Comunicaciones, Transporte y Obras Públicas. Guatemala
- IPGRI. 2004. *Why genetic diversity matters*. Plant Genetic Division of The Crop Science Society of America. Marchesi Grafiche Editorial. 20pp.
- Karp, A; et al. 1997. *Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies*. Internacional Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Technical Bulletin, 2:1-46 Roma.
- Lafitte, H.R. 2001. *Estreses abióticos que afectan al maíz*. En: *El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción*. Colección FAO: Producción y protección vegetal. Departamento de agricultura. USA. 96pp.
- Lafitte, H.R. 2001a. *Mejoramiento para resistencia a los estreses abióticos*. En *El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción*, Colección FAO: Producción y protección vegetal. Departamento de agricultura. USA. 96pp.
- Lu, H. y R. Bernardo. 2001. *Molecular marker diversity among current and historical maize inbreds*. *Theor. Appl. Genet.* 103:613-617
- Guatemala. 2003. Unidad de Políticas e Información Estratégica –Área de Información-. *Características de la Producción Agrícola* (Fichas de Resumen). Guatemala, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. www.maga.gob.gt (2004)
- Maselli, Silvana. 1997. *Evaluación de estado de conservación y de la diversidad genética de semillas de crucíferas depositadas en el banco de germoplasma de la escuela técnica superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid*. España, Madrid. Universidad Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid
- Romani, Michela. 2001. *América Económica. Seminario de Información económica y financiera*. Asesores de publicaciones C. A.
<http://www.americaeconomica.com/numeros21/121/reportes/michela121htm>. (2004)

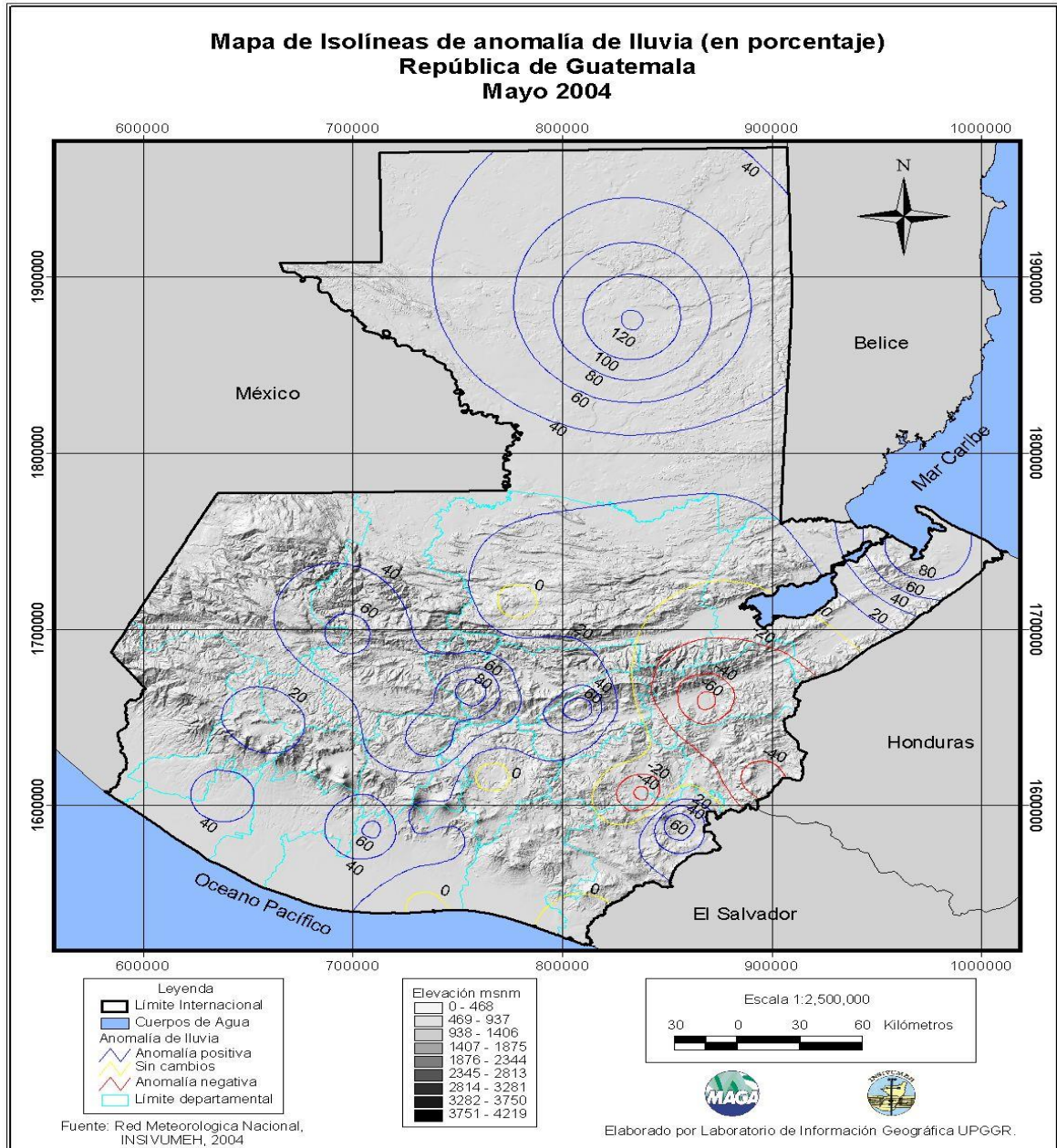
- Nei, M. 1972. *Genetic distances between populations*. Am. Natur. 106:238-292
- Orozco, Carlos. 2004. *Situación actual de la biotecnología en Guatemala*. Documento técnico No. 17 (06-2004), Presidencia de la República. Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP). Guatemala, Guatemala. 86pp.
- Paliwal, R.L. 2001. *Citogenética del maíz tropical*. En: El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción, Colección FAO: Producción y protección vegetal. Departamento de agricultura. USA. 96pp.
- Powell, W; et al. 1996. *The comparison of RFLP, RAPD, AFLP y SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis*. Molecular Breeding. 2:225-238.
- Rao, R. y W. Riley. 1994. *The use of Biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources*. Newsletter 97:3-20
- Reyes, M. 2001. *La rentabilidad social de la investigación agrícola subgubernamental en granos básicos*. ICTA- sector público agrícola. Guatemala, Guatemala. 104pp.
- Ribaut, J. M.; et al. 1996. *Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. I Flowering parameters and the anthesis-silking interval*. Theor Appl Genet. 92:905-914.
- Ribaut, J.; et al. 1997. *Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. II. Yield components and marker-assisted selection strategies*. Theor Appl Genet. 94:887-896
- Rojas, Flavio. 1988. *La cultura de maíz en Guatemala*. Ministerio de Cultura y Deportes, Guatemala, Guatemala. 146pp.
- Guatemala. 2003. *Consumo aparente de maíz, frijol, arroz y maicillo, 1996-2003*. Secretaría de Integración económica centroamericana. Guatemala, Guatemala
- Salazar, Pedro. 1990. *El cultivo del maíz en el estado Trujillo*. Revista de difusión de tecnología agrícola y pesquera del FONAIAP. Fonaiap Divulga Versión Digital. <http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fdivul.html> (2004)
- Sari-Gorla, M.; et al. *Genetic análisis of drought tolerante in maize by molecular markers. II. Plant height and flowering*. Theor. Appl Genet. 99:289-295.
- Scaltsoyiannes, A.; R. Rohr y K. P. Panetsos. 1994. *Allozyme frecuency distributions in five European populations of black pine (Pinus nigra Amold)*. Silvae Genetica 43 (1):20-30.

- Stuber, C. W.; M. M. Goodman, y R. H. Moll. 1982. *Improvement of yield and ear number resulting from selection at allozyme loci in a maize population*. *Crop Science*. Vol 22
- Teixeira, Claudia. 2001. *Técnicas moleculares aplicadas ao melhoramento do milho*. V Simposio de Atualização em Genética e Melhoramento de Plantas. Universidade Federal de Lavras. Brasil.
<http://www.nucleoestudo.ufla.br/gen/eventos/simposios/5simpo/resumos/clauidateixera.htm> (2004)
- Torres, M. F. 1979. *Introducción de semillas mejoradas de maíz (Zea mays L.) en la cabecera departamental de El Progreso, Rancho, Júcaro, y San Cristóbal Acasaguastlán*. Tesis Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. Guatemala, Guatemala. 74pp.
- Vásquez, F.; et al. 1988. *El maíz en el siglo XXI, nuevas tendencias en la biotecnología de la industria alimentaria y sus efectos en la sociedad y el medio ambiente*. Magna Terra Editores. Guatemala, Guatemala.
- Vavilov, N.Y. 1926. *Studies on the origins of cultivated plants*. *Bulletin of Applied Botany and Plant Breeding*, 16: 1-245
- Warburton, M. et al. 2002. *Genetic characterization of CIMMYT inbred maize lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods*. *Crop. Sci.* 42:1832-1840.
- Yao, Y. P. y M. A. Tigerstedt. 1993. *Isozyme studies of genetic diversity and evolution in Hippophae*. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 40:153-164

VII. ANEXOS

Figura 34. (1) Mapa de isolas de anomalía de lluvias, Mayo

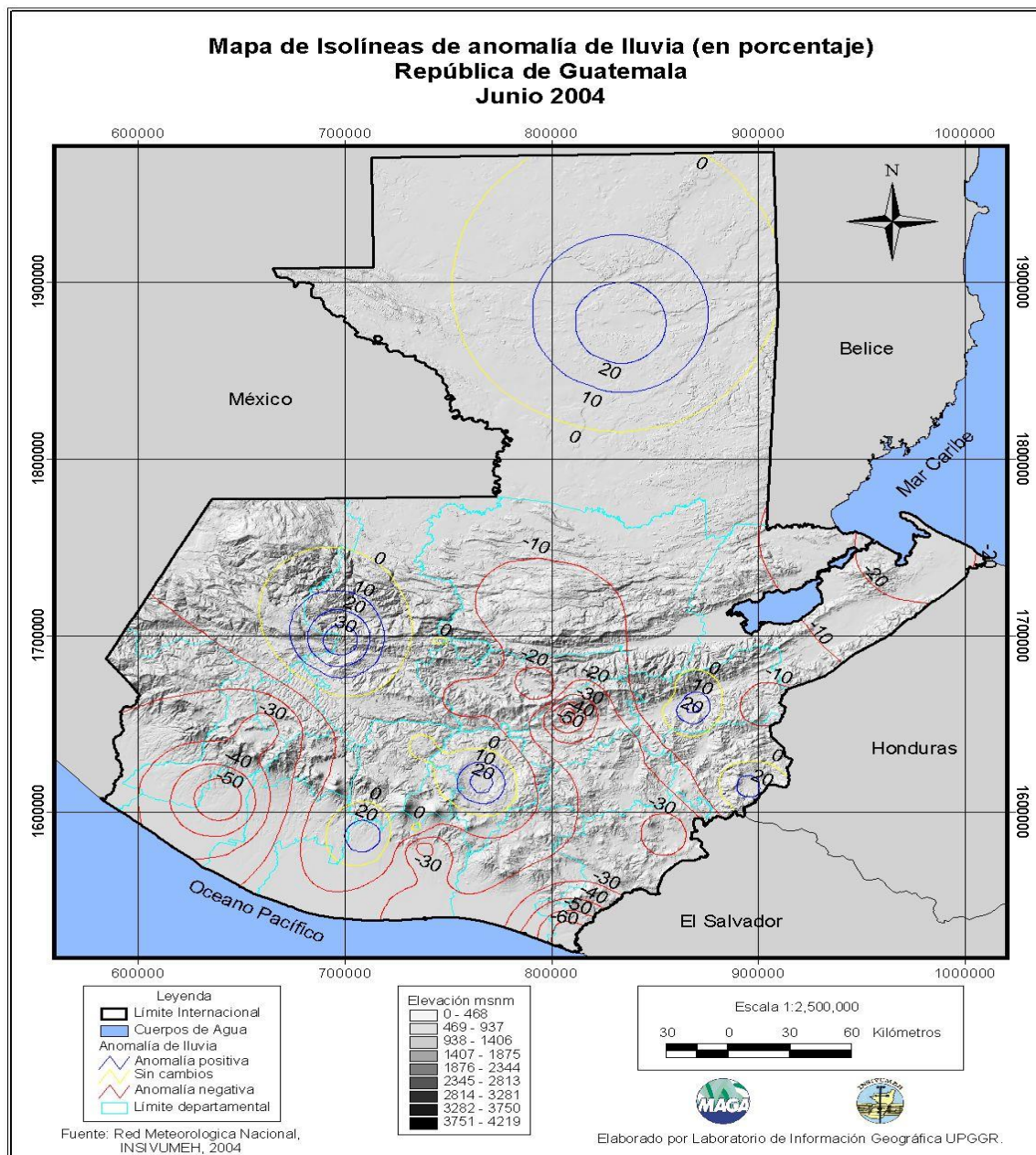
ANEXO A



Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, 2005

Figura 35. (2) Mapa de isólinas de anomalía de lluvias, Junio

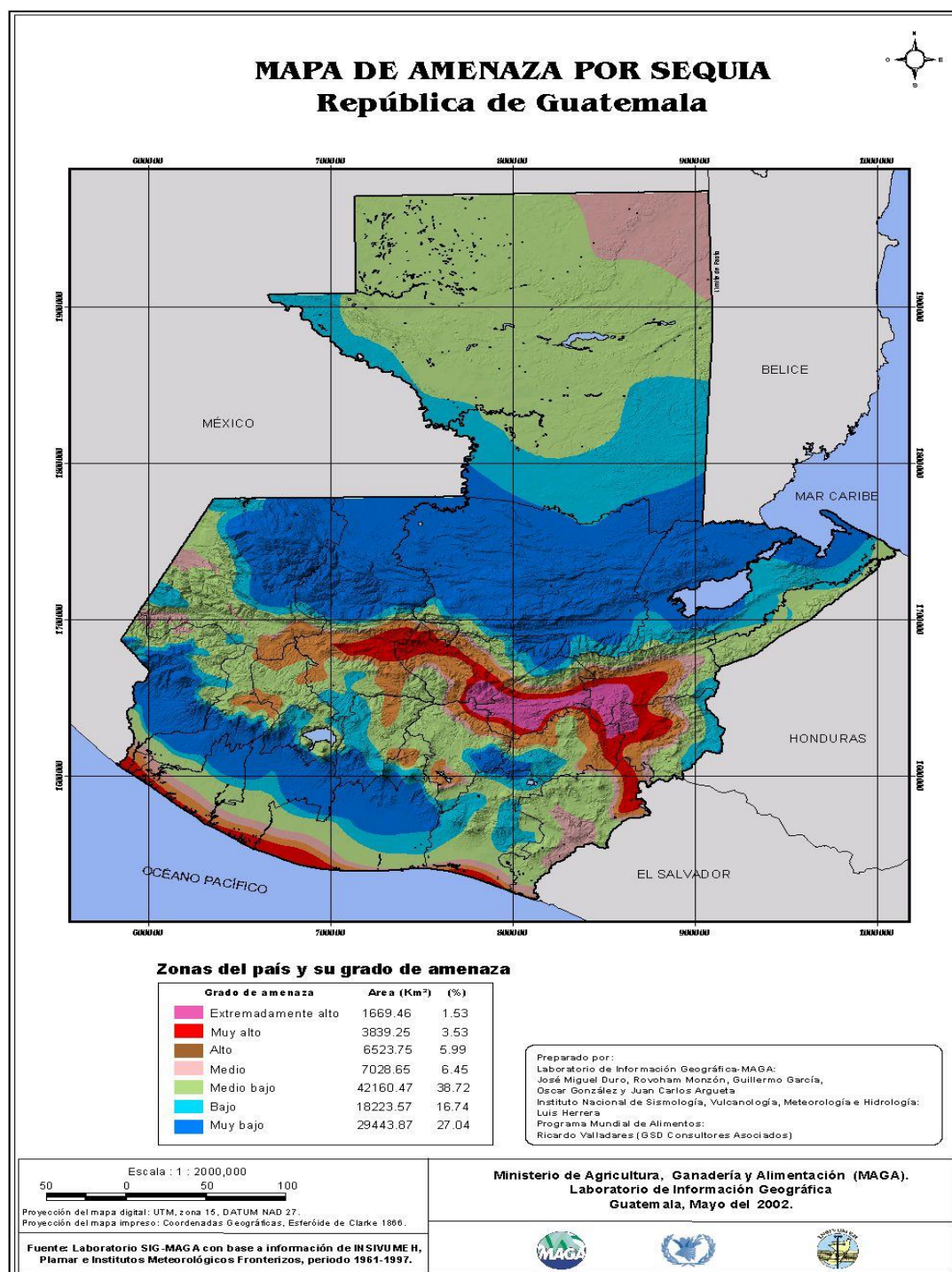
ANEXO B



Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, 2005

Figura 36. (3) Mapa de amenaza por sequía, República de Guatemala

ANEXO C



Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, 2005

Recetas de soluciones stock

Solución de almacenamiento de ADN extraído

Cuadro 22. TE-8: 10mM tris/8.0, 1mM EDTA-pH 8.0

Reactivo/Solución madre	100ml
1M tris pH 8.0	1.0 ml
0.5M EDTA ph 8.0	0.2 ml
ddH ₂ O*	aforar al volumen

*ddH₂O = Agua destilada

Solución para preparación de acrilamida 5% y buffer de corrida

Cuadro 23. Buffer TG10X

Reactivo/Stock	1000ml
Trizma Base	144 g
Glicina	30 g
DdH ₂ O	1000 ml

Solución de carga de geles

Cuadro 24. Solución de colorante

Reactivo/ stock	5 ml
Azul de bromofenol	0.0125 g
Xileno cianol	0.0125 g
TE pH8	4.25 ml
Glicerol	0.75 ml

Soluciones de Tinción

Cuadro 25. Solución fijadora

Reactivo/Stock	1000 ml
ddH ₂ O	895 ml
Etanol absoluto	100 ml
Acido acético glacial puro	5 ml

Cuadro 26. Solución de Tinción (AgNO₃ (0.2%))

Reactivo/Stock	200 ml
AgNO ₃	0.4 g
DdH ₂ O	200 ml

Cuadro 27. Solución Revelado 3% NaOH + 0.5 ml/100 ml formaldehído

Reactivo/Stock	800 ml
NaOH	24 g
dd H ₂ O	800 ml
Formaldehido	4 ml

**agregue el FORMALDEHIDO justo antes de utilizar la solución, bajo campana.

Cuadro 28. Solución Stopper (de inhibición de la reacción)

Reactivo/Stock	1000 ml
Na ₂ EDT 2H ₂ O	30 g
Dd H ₂ O	1000 ml

ABREVIATURAS

CTAB	Bromuro de alquiltrimetilo de amonio mixto
dNTPs	5'-trifosfato de desoxinucleosidos
EDTA	Tetracetato de atilendiamida
RAPDs	DNA polimórficos amplificados al azar
RFLPs	Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
SSR	Secuencias simples repetidas
TE	Tris-EDTA (amortiguador)