



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
ESCUELA DE AGRONOMÍA  
POSTGRADO DE AGRONOMÍA  
MENCION MEJORAMIENTO GENÉTICO Y BIOTECNOLOGÍA

Trabajo de Grado

**Análisis de avance genético observado en un programa de selección  
recurrente medios hermanos en Maíz (*Zea mays* L.)**

Sioly Dainiznoray Becerra Zambrano

Tutor: Dr. Luis Angulo

Maracay, julio de 2017.

Trabajo de Grado presentado como requisito final para optar al título de **“Magister Scientiarum”** en Agronomía Mención Mejoramiento de plantas y Biotecnología Agrícola.

Comité Consejero

Dr. Luis Angulo  
Tutor

## DEDICATORIA

## AGRADECIMIENTOS

## TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
TABLA DE CONTENIDO.....	v
LISTA DE CUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	12
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	15
Objetivo General.....	15
Objetivos Específicos.....	15
ANTECEDENTES.....	16
ASPECTOS GENERALES DEL MAÍZ ( <i>Zea mays</i> L.).....	16
Clasificación Taxonómica del Maíz.....	16
Aspectos Morfológicos de la Planta.....	17
SELECCIÓN RECURRENTE.....	17
Selección recurrente recíproca:.....	18
Selección recurrente de medios hermanos:.....	18
Selección recurrente de hermanos completos:.....	18
Selección recurrente de líneas S1:.....	19
Selección recurrente de líneas S2:.....	19
Selección Recurrente en Maíz.....	19
AVANCE GENÉTICO.....	20
Regresión Lineal.....	20
DIVERSIDAD GENÉTICA EN MAÍZ.....	20
MARCADORES MOLECULARES.....	21
Microsatélites.....	22

MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
Material Vegetal .....	23
Etapa I: Evaluación Agronómica .....	23
a. Ubicación del Ensayo.....	23
b. Condiciones Climáticas.....	24
c. Manejo Agronómico .....	24
Diseño Experimental .....	25
Variables Evaluadas.....	25
- <i>Variables Agronómicas</i> .....	25
Análisis Estadístico .....	27
Etapa II: Evaluación Molecular.....	29
Lugar para la evaluación molecular .....	29
Estudio de Diversidad Genética .....	29
Material Vegetal.....	29
Microsatélites (SSR).....	30
- Metodología .....	32
Estudio de poblaciones.....	36
Material Vegetal.....	36
- Metodología .....	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
Etapa I. Evaluación Agronómica .....	39
- Establecimiento del ensayo .....	39
- Variables Agronómicas.....	40
Estimación del avance genético para características morfológicas.....	48
Etapa II: Evaluación Molecular.....	50
Extracción ADN.....	50
1. Estudio de Diversidad Genética .....	52
2. Variabilidad Genética Ciclo 1 y Ciclo 2.....	57
CONCLUSIONES.....	59
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	60

## LISTA DE CUADROS

	Pág.
1 Datos de los últimos años sobre rendimiento, superficie cosechada y producción de maíz en Venezuela.	16
2 Identificación de las 7 variedades de maíz ( <i>Zea mays</i> , L) utilizados en la evaluación de avance genético del programa de Selección Recurrente de medios hermanos de la UNET 2012-2015.	23
3 Fuentes de variación, Grados de libertad, Suma de cuadrados, Cuadrados medios, Esperanza de los cuadrados medios y prueba de F del análisis de varianza para cada ensayo.	28
4 Identificación de los 8 materiales de maíz ( <i>Zea mays</i> , L) utilizados en el estudio de diversidad genética con marcadores microsatélites SSR.	29
5 SSR utilizados para el estudio de diversidad genética de los 8 materiales de maíz ( <i>Zea mays</i> L.).	30
6 Porcentaje de germinación a los 21 después de la siembra para cada genotipo.	39
7 Estadística descriptiva para las variables altura de la planta (AP), altura de la mazorca (AM), porcentaje de acame (A), floración masculina (FM), floración femenina (FF), longitud de la mazorca (LM), diámetro de la mazorca (DM), peso de la mazorca (PM), granos por hilera (GH), hileras por mazorca (HM), diámetro de la tusa (DT), peso de 100 granos (P100G), rendimiento (R).	43
8 Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables altura de planta (AP), altura de mazorca (AM), floración masculina (FM), floración femenina (FF).	44
9 Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables longitud de mazorca (LM), diámetro de la mazorca (DM), peso total de la mazorca (PM), granos por hilera (GH), hileras por mazorca (HM), diámetro de la tusa (DT), peso de 100 granos (P100G), rendimiento Kg.ha <sup>-1</sup> (R).	46

10	Prueba de comparación entre medias de Duncan para las variables altura de planta (AP), altura de mazorca (AM), floración masculina (FM), floración femenina (FF) para los 5 genotipos.	48
11	Prueba de comparación entre medias de Duncan para las variables granos por hilera (GH), hileras por mazorca (HM), peso de 100 granos (P100G) para los 5 genotipos.	48
12	Comparación de Método de Extracción de ADN para muestras de procedencia de semilla hidratada y tejido vegetal viejo.	51
13	Valores de contenido de información polimórfica (PIC) obtenidos en el presente estudio para los 23 marcadores SSR.	53
14	Número de alelos y tamaño (pb) obtenidos para 32 SSR amplificados con los 8 materiales de maíz.	54
15	Índice de similaridad y distancia de Dice para los 8 materiales utilizados en el estudio de polimorfismo.	55
16	Frecuencia alélica de cada alelo para el locus <i>phi011</i> entre los ciclos 1 y 2 de la población Diente de Caballo.	58
17	Heterocigosis observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) para el SSR <i>phi011</i> en los ciclos 1 y 2 de la población Diente de Caballo.	58

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
1	49
Regresiones de la altura de planta y altura de mazorca con relación a las variedades experimentales Ciclo 1 y Ciclo 2.	
2	49
Regresiones de la floración masculina y floración femenina con relación a las variedades experimentales Ciclo 1 y Ciclo 2.	
3	51
Comparación de protocolo de extracción de ADN modificado a partir de muestras de procedencia de semilla hidratada y tejido vegetal viejo. ( <b>1, 2, 3, 4,5:</b> Tejido vegetal viejo de población Ciclo 2; <b>Pg:</b> progenitor; <b>C0:</b> Ciclo 0; <b>C1:</b> Ciclo1; <b>C2:</b> Ciclo 2; <b>In:</b> INIA S7; <b>Sin:</b> Sin mercaptoetanol; <b>Con:</b> Con mercaptoetanol).	
4	52
Evaluación de 45 marcadores tipo microsatélites en 8 materiales de maíz.	
5	56
Dendograma por medio del logaritmo UPGMA obtenido para 8 variedades de maíz, con 23 SSR polimórficos.	
6	57
Relaciones genéticas entre los 8 materiales de maíz obtenidas a partir del análisis de coordenadas principales.	

## RESUMEN

El maíz ocupa el tercer rubro cosechado en el mundo. En Venezuela es el cultivo más importante, por la dieta diaria del venezolano y como fuente generadora de empleos. El uso de variedades representa un aporte sustancial. Es importante valorar la diversidad genética y evaluar el potencial agronómico de las poblaciones de maíz. La presente investigación se planteó el avance genético en un programa de mejoramiento de la UNET; integrando el trabajo y cooperación interinstitucional como pilar fundamental para lograr avances en el país. Se evaluaron 7 genotipos en la etapa agronómica y 8 materiales en la etapa molecular. No se observaron diferencias significativas en las variables morfológicas y agronómicas entre genotipos. En el análisis de regresión lineal se presentó un aumento para las variables altura de planta y mazorca y un descenso para floración masculina y femenina, evidenciando la obtención de plantas más precoces. Se utilizaron 45 SSR de los cuales 23 fueron polimórficos, con un valor promedio de alelos por locus de 2,28 para un total de 73 alelos, se obtuvo un PIC de 0,48. El dendograma UPGMA arrojó la formación de cinco grupos por distancia y similitud genética de Dice, en el análisis de coordenadas principales permitió la agrupación de los materiales pertenecientes al programa de mejoramiento (Pg, CO, C1, C2 y Diente de caballo). El valor de PIC en el ciclo 1 fue de 0,5237 y en ciclo 2 de 0,4468. La  $H_o$  fue menor a la  $H_e$  en ambos ciclos para el locus *phi011*. Se presentó una estrecha variabilidad genética, es necesario refrescar el programa de mejoramiento con otros materiales y obtener resultados importantes en las variables de interés.

**Palabras clave:** SSR, regresión lineal, Contenido de información polimórfica (PIC), heterocigosidad.

## ABSTRACT

Maize is the third crop harvested in the world. In Venezuela is the most important crop, for the daily diet of Venezuelan and as a source of employment. The use of varieties represents a substantial contribution. It is important to assess genetic diversity and evaluate the agronomic potential of maize populations. The present research considered the genetic advance in a program of improvement of the UNET; Integrating work and inter-institutional cooperation as a fundamental pillar to achieve progress in the country. Seven genotypes were evaluated in the agronomic stage and 8 in the molecular stage. There were no significant differences in morphological and agronomic variables between genotypes. In the linear regression analysis it was presented increasing for the variables plant height and ear and descent for male and female flowering, evidencing the obtaining of earlier plants. We used 45 SSRs of which 23 were polymorphic, with a mean value of alleles per locus of 2.28 for a total of 73 alleles, a PIC of 0.48 was obtained. The UPGMA dendrogram showed the formation of five groups by distance and genetic similarity of Dice, in the analysis of main coordinates allowed the grouping of the materials belonging to the breeding program (Pg, CO, C1, C2 and Horsetooth). The value of PIC in cycle 1 was 0.5237 and in cycle 2 of 0.4468. The  $H_o$  was lower than the  $H_e$  in both cycles for the phi011 locus. There was a close genetic variability, it is necessary to refresh the breeding program with other materials and obtain important results in the variables of interest.

**Key words:** SSR, linear regression, polymorphic information content (PIC), heterozygosity.

## INTRODUCCIÓN

La domesticación del maíz se ha reportado hace 8.000 años aproximadamente en Mesoamérica, unas 50 variedades han evolucionado bajo la selección agrícola en México. En Venezuela, el maíz ha sido originario de introducciones antiguas que tienen conexión con las razas Nal-Tel, Zapalote Chico, Tepecintle y Salvadoreño (mexicanas y centroamericanas). La modernización del maíz se inicia en 1939 incorporando cultivares mejorados, a partir de cultivares locales y del intercambio de líneas con Colombia, México, América Central y el Caribe que constituyen el germoplasma base para el desarrollo de nuevas variedades e híbridos (Segovia y Alfaro, 2009).

El maíz ocupa el tercer rubro cosechado en el mundo después del trigo y el arroz, destacando un número considerable de variedades existentes, permitiendo así su manejo en un rango relevante de condiciones climáticas (Fassio *et al.*, 1998). La producción mundial se estima en aumento al 1% que representa cerca de los 5 millones de toneladas, cosechas abundantes relacionada con las condiciones atmosféricas favorables en comparación con Europa y América del Sur (Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: FAO, 2015).

En Venezuela el maíz representa el cultivo más importante del sector agrícola, por su importancia en la dieta diaria del venezolano y como fuente generadora de empleos (Segovia y Alfaro, 2009).

El 76 % de los híbridos sembrados en el país son importados por preferencia de los agricultores para obtener cosechas de alto rendimiento (Confederación de Asociaciones de Productores agropecuarios -FEDEAGRO, 2015).

La producción nacional ha decaído cerca del 20%, así como también la superficie sembrada de maíz blanco y amarillo en los principales estados del país, cubriendo la demanda con importaciones del rubro (Barrios y Bolotín, 2012).

La FAO (2014) reflexiona sobre la asistencia técnica que debe brindarse a los países con déficit de producción presentado como consecuencia de conflictos, desastres naturales,

malas cosechas y altos precios internos de los alimentos. En América del Sur se estiman resultados de abastecimiento favorables para países productores de maíz como Argentina y Brasil.

El Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP), ha contribuido en la agroindustria de este rubro desarrollando cinco nuevos cultivares de maíz de grano blanco y alta calidad de proteína la variedades INIA SQ-1 e INIA SQ-2 y el híbrido INIA QPM-2 ideales para la fabricación de harinas precocidas, de grano amarillo el híbrido simple INIA 21 con alto contenido de almidón propicio para la elaboración de alimentos balanceados y de almidones industriales, y de grano blanco duro el híbrido simple INIA 68 para la producción de harinas precocidas (Segovia y Alfaro, 2009).

En Venezuela, se continúan sembrado materiales que han sido rendidores para los agricultores (híbridos de Pioneer, Monsanto, Danac, Himeca, INIA; SEFLOARCA y Prosevenca) (Barrios y Bolotín, 2012). Anteriormente, se observó un incremento en los rendimientos producto de la incorporación de nuevos genotipos, donde se destaca el híbrido CENIAP PB-8 abarcando un 80 % de la superficie nacional cosechada para la fecha. A pequeños productores se le benefició con la variedad CENIAP DMR (Segovia y Alfaro, 2009).

La selección natural como parte del proceso evolutivo de las plantas, para su automejoramiento se da en periodos lentos, por lo cual el hombre ha realizado durante muchos años selección masal del maíz, que ha sido cultivado en diferentes ambientes, dando lugar a una amplia variabilidad genética de la especie en la actualidad (Coyac *et al.*, 2013).

El uso de variedades puede representar un aporte sustancial en el ámbito social ante el compromiso de las instituciones de atender a los pequeños y medianos productores, con la posibilidad de obtener sus propias semillas de manera artesanal. Además, de contribuir a la disminución en la importación y compra de aminoácidos usados para la alimentación balanceada de los animales monogástricos, sustituyéndolos con la utilización de este tipo

de maíces (Segovia y Alfaro, 2009).

En este sentido, es importante valorar la diversidad genética y evaluar el potencial agronómico de las poblaciones de maíz. La presente investigación se plantea el avance genético observado en un programa de selección recurrente de maíz, enmarcado en el Programa de Mejoramiento Genético y ejecutado por el Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional Experimental del Táchira, en el periodo 2012-2015, permitiendo dar continuidad al programa y realizar las evaluaciones de los ciclos de selección recurrente, para lograr la certificación de una variedad mejorada de maíz amarillo, que sea accesible al pequeño productor de la zona, ante la escasez notable de semilla; integrando el trabajo y cooperación interinstitucional como pilar fundamental para lograr avances en el país.

## **OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **Objetivo General**

- Analizar el avance genético observado en un programa de selección recurrente de medios hermanos en maíz del Programa de Mejoramiento Genético del Departamento de Agronomía UNET en el periodo 2012-2015.

### **Objetivos Específicos**

- Determinar el progreso genético de características agronómicas de materiales obtenidos en el programa de selección recurrente de maíz en los ciclos C0, C1 y C2.
- Caracterizar genéticamente ocho materiales de maíz a través de marcadores moleculares tipo microsatélites.
- Verificar la variabilidad genética de la población Diente de caballo Ciclo 1 y el mantenimiento de la misma después de un ciclo de selección, por medio de microsatélites.

## ANTECEDENTES

### ASPECTOS GENERALES DEL MAÍZ (*Zea mays* L.)

Ante el incremento de la población mundial este rubro se convierte en un cereal que debe ser explotado para cubrir la demanda alimentaria, destacando sus ventajas por el alto potencial de producción que puede obtenerse en los países del trópico (Paliwal *et al.*, 2001). La mayor colección de semillas de maíz se encuentra en la sede del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) en una cámara climatizada convirtiéndose en la institución con la principal fuente de recursos genéticos para los investigadores agrícolas.

En Venezuela para el 2009 el 80% de la superficie sembrada fue representada por cultivos de industrias transnacionales, por lo que el inventario del Servicio Nacional de Semillas (SENASA) no indica las importaciones de maíz (Segovia y Alfaro, 2009). De igual forma según los datos del rendimiento, observados en el Cuadro 1, superficie cosechada y producción de este rubro en Venezuela para los años 2009-2013, sin incluir el volumen de importación que se realiza para el abastecimiento local.

**Cuadro 1.** Datos de los últimos años sobre rendimiento, superficie cosechada y producción de maíz en Venezuela.

Variable	2009	2010	2011	2012	2013
Rendimiento (Kg.ha <sup>-1</sup> )	2.530	3.121	3.380	3.058	3.653
Superficie Cosechada (ha)	783.314	799.712	626.560	573.013	615.097
Volumen de producción (Ton)	1.981.931	2.496.207	2.117.710	1.752.513	2.247.044

Fuente: FEDEAGRO (2015)

#### Clasificación Taxonómica del Maíz

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Liliopsida

**Orden:** Poales

**Familia:** Poaceae

**Género:** Zea

**Especie:** *Zea mays*

(National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2015).

### **Aspectos Morfológicos de la Planta**

En el maíz se destacan sus raíces ya que aportan un perfecto sistema de anclaje siendo fasciculadas, robustas y reforzándose con la presencia de raíces adventicias. El tallo es de porte erecto y no posee ramificaciones. Las hojas son alternas y su número dependerá del cultivar, ciclo, época de siembra, entre otros. Esta última característica ha sido relacionada con el potencial de producción. La parte superior corresponde a la inflorescencia masculina o panoja. Es una planta monoica, cada flor fecundada propiciará la formación de un grano que se agrupará a un eje, destacando que el número de granos y de filas de la mazorca dependerá de la variedad y del vigor del maíz (Ortas, 2008).

La anatomía del maíz es propia de las plantas C4, por lo que resulta de gran importancia en países del trópico, el estudio y explotación se debe tomar en cuenta para aumentar su productividad debido a la variación de genotipos de maíz tropical (Paliwal *et al.*, 2001)

El maíz es uno de los cereales más eficientes en la conversión de energía solar (Fassio *et al.*, 1998).

Actualmente, para la siembra de maíz se ha prescindido de numerosas labores agronómicas, ahora basada en la siembra directa donde se ha demostrado que en presencia de suelos fértiles, estructurados y profundos que permitan el desarrollo de raíces se ha logrado un perfecto desarrollo vegetativo alcanzando su máxima producción (Ortas, 2008).

### **SELECCIÓN RECURRENTE**

Las metodologías de selección se dividen en intrapoblaciones, donde se aprovecha la varianza genética aditiva e interpoblacionales con la varianza aditiva y de dominancia (Moreno-Pérez *et al.*, 2004) además la primera mejora la media poblacional e incrementa

la probabilidad de desarrollar híbridos y variedades mejoradas superiores (Mendoza *et al.*, 2000).

Este método se diferencia de la selección masal (no comprende evaluación de las progenies seleccionadas) ya que inicialmente se realiza el muestreo de la población, seguido de la evaluación de las progenies y por último la recombinación o cruzamiento de las progenies seleccionadas, para la formación del ciclo siguiente de la población y así dar continuidad a la selección y el mejoramiento (Paliwal *et al.*, 2001). El objetivo final de este método es incrementar de forma gradual la frecuencia de alelos favorables de carácter de herencia cuantitativa manteniendo una alta variabilidad y asegurando un mejoramiento genético progresivo de las poblaciones (García *et al.*, 1999).

A continuación, se describen los diferentes métodos de selección recurrente:

**Selección recurrente recíproca:**

Se utiliza para el desarrollo de dos poblaciones base donde se busca incrementar la frecuencia de genes para caracteres cuantitativos hereditarios por repetición de ciclo, señalado como un sistema de mejoramiento interpoblacional (Fuentes *et al.*, 1998).

**Selección recurrente de medios hermanos:**

Basándose en el comportamiento del surco así como en la planta individual (Paliwal *et al.*, 2001). Se utilizan familias de medio hermanos, no requiere hacer polinización manual por lo cual resulta fácil en su ejecución, permite el uso de mayor cantidad de progenies por su simple aplicación, la endogamia es reducida, cada ciclo es representado por tres generaciones (Paterniani, 1967).

**Selección recurrente de hermanos completos:**

Como cruza biparentales requiere de dos generaciones para completar un ciclo de selección este método con pedigrí lo cual permite la evaluación de los genotipos en base a su aptitud de capacidad combinatoria. Además, evita la endogamia en cada ciclo de selección, ya que permite conocer los ancestros comunes en la formación de las nuevas Familias de Hermanos Completos (Mendoza *et al.*, 2000). Ha sido usado de manera exitosa para la evaluación de rendimiento, reducción en la altura de la planta, altura de la

mazorca, tamaño de la panoja, precocidad, esterilidad, índice de cosecha, tolerancia a sequía y tolerancia a insectos y enfermedades (Paliwal *et al.*, 2001). Este método ha sido utilizado en el CIMMYT para incrementar el rendimiento de grano principalmente (Maya y Ramírez, 2002).

#### **Selección recurrente de líneas S1:**

Se realiza autofecundación en poblaciones cruzadas al azar para producir un gran número de S1. Requiere la evaluación en ensayos replicados de esas familias, y se aplica tres estaciones por ciclo (Paliwal *et al.*, 2001). Este método utiliza muy bien los efectos aditivos y reduce la depresión endogámica (Navarro *et al.*, 1992).

#### **Selección recurrente de líneas S2:**

En este caso similar a S1 se obtienen planta fecundadas por dos generaciones con o sin la selección de familias S1, estableciendo cuatro estaciones por ciclo para poder llegar hasta el nivel de endocría S2 antes de la selección (Paliwal *et al.*, 2001).

#### **Selección Recurrente en Maíz**

García *et al.* (1999) desarrollaron un programa de selección recurrente de familias de hermanos completo con seis poblaciones tropicales de maíz evaluadas en cinco ambientes en Venezuela lo cual les permitió una población blanca y dos poblaciones amarillas para la utilización como variedades y/o líneas. En este caso los ciclos avanzados presentaron un mayor rendimiento destacando que la selección recurrente de familias de hermanos completos mejoró de manera significativa el comportamiento agronómico de las poblaciones estudiadas.

Montilla (2002) estimó los efectos de la selección recurrente recíproca de familia de hermanos completos, en dos poblaciones tropicales. Se utilizaron diez testigos en tres localidades de Aragua, donde seleccionaron el 10% de las familias; calculando un promedio de rendimiento mayor entre estas, en comparación con el promedio total de las familias y testigos evaluados. Se logró obtener una adecuada variabilidad genética para el mejoramiento continuo del cruce entre ambas poblaciones.

## **AVANCE GENÉTICO**

La determinación del avance genético en maíz ha resultado ser eficaz en el método de selección recurrente, donde se busca maximizar el mejoramiento genético y la contribución a futuros avances genéticos significativos, funcionando de forma predictiva ante un programa de mejoramiento (Hallauer *et al.*, 2010).

Pérez-Colmenares *et al.* (2007) en un programa de selección masal de razas tropicales y sub-tropicales de maíz en México determinan el avance genético promedio por ciclo de selección para la variable rendimiento de mazorca por planta que van desde 2,5 % en Celaya hasta 24,6% en Pepitilla.

Benítez (2002) bajo en el método de selección recurrente fenotípico simple en maíz compara el avance alcanzado entre plantas provenientes de la semilla básica y plantas de semilla seleccionada observando avance genético de 18% desde el primer ciclo de selección en cuanto a la variable de rendimiento que principalmente se logró por la selección de mazorcas de mayor peso.

### **Regresión Lineal**

El modelo de regresión lineal es adaptable a una amplia gama de situaciones, donde se considera la expresión de la recta al estimar valores de Y basados en diferentes valores que se obtendrán desde X (García, 2015). Este modelo es posible evaluarlo y validarlo a través del coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) calculado a partir de las variables propuestas (Bocco *et al.*, 2015).

## **DIVERSIDAD GENÉTICA EN MAÍZ**

La gran diversidad de maíz en las zonas nativas principalmente es producto de una amplia diversidad geográfica donde se cultiva y las culturas adoptadas por cada una de estas poblaciones, que a través de los años los antiguos agricultores han seleccionado bajo diferentes condiciones ambientales, generando un número considerable de variedades de maíz.

La diversidad genética del maíz es única, y más allá de cumplir con una demanda alimenticia, es también preservada para la identidad y tradición de las civilizaciones, considerando el mayor resguardo de esta diversidad en los campos de los agricultores, de tal fin que es superior a la que pudiese conservarse en un banco de germoplasma (CIMMYT), enfatizando en la selección continua que ejercen estos materiales ante condiciones climáticas cambiantes (O'Leary, 2016).

Este proceso de conservación de la diversidad genética en maíz incluye directamente la incorporación tanto de variedades mejoradas como variedades criollas, sometiénolas a condiciones ambientales diversas que les permiten obtener respuestas de adaptabilidad que será reconocido por los propios agricultores (Rodríguez *et al.*, 2016).

### **MARCADORES MOLECULARES**

Un marcador molecular es una secuencia de ADN específica en el cromosoma, que puede ser detectada con facilidad en los organismos permitiendo el seguimiento de la herencia de los individuos en una población. El uso de los marcadores moleculares se basa en polimorfismo que ocurre naturalmente en el ADN. Un marcador molecular debe ser polimórfico, pues es necesario que existan diferentes formas, ya que esta ocurrencia simultánea frente a rasgos en la misma población con dos o más variantes discontinuos o genotipos, permitirá distinguir la información de los genes en presencia de dicho marcador (Chawla, 2000).

En la actualidad se han obtenido grandes avances en estudios de variabilidad genética, estudios poblacionales evolutivos con el uso de marcadores moleculares dentro de los más útiles se encuentran los ADN polimórficos al azar o RAPD (por sus siglas en inglés: *random amplification of polymorphic DNA*); el polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados al azar o RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), los fragmentos polimórficos amplificados al azar o AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) y las simples secuencias repetidas o SSR (*simple sequence repeat*). Este último marcador es bastante discriminante por su elevado nivel de polimorfismo y ser un marcador codominante (Pérez De La Vega, 2010).

### **Microsatélites**

Los microsatélites (SSR o STR) (*Short Tandem Repeats*) muy abundantes en el genoma de los organismos eucariota. Son secuencias cortas de 1 a 4 pares de bases que se repiten en bloque a lo largo del ADN, cada una de estas secuencias se definen por el tipo de unidad repetitiva y el sitio que ocupan en el genoma, es posible lograr su amplificación por medio de PCR con el uso de pares de cebadores (*primers*) diseñados especialmente. Debido al alto grado de polimorfismo se han convertido en uno de los marcadores más usados en estudios de importancia (Hernández *et al.*, 2010).

Para la valoración de la diversidad del maíz, los marcadores moleculares han sido de gran aceptación, ya que explora directamente el genoma y no presentan influencia por el ambiente, en contraste con los ensayos en campo, donde se evalúan características morfológicas para analizar diversidad genética (Muñozcano, 2011).

Hernández *et al.* (2010) señalan que con el apoyo de marcadores moleculares es posible obtener información de los cultivares de maíz para los programas de mejoramiento, en poco tiempo y reduciendo los ensayos de pruebas en campo que necesitan de gastos significativos, permitiendo además la caracterización molecular de genotipos y uso eficiente de la variabilidad genética. Es importante destacar que el uso de marcadores SSR ha sido discriminante para el análisis genético en líneas de maíz en comparación con otros marcadores moleculares como los RAPD.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Vegetal

Se evaluaron 7 variedades de maíz amarillo, dentro de las cuales 4 son pertenecientes al programa de mejoramiento genético del Departamento de Agronomía Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET) entre los años 2012 y 2015, bajo la responsabilidad del equipo de Investigaciones Genéticas: Profesores Bridget Moreno y José Barragán, empleando el método de selección recurrente de medios hermanos; 1 variedad criolla mejorada artesanalmente por los productores de la zona (Rubio, Edo. Táchira) y 2 variedades comerciales mejoradas (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Identificación de las 7 variedades de maíz (*Zea mays*, L) utilizados en la evaluación de avance genético del programa de Selección Recurrente de medios hermanos de la UNET 2012-2015.

No.	Genotipo	Tipo	Procedencia
1	Progenitor	Variedad criolla	Rubio
2	Ciclo 0	Variedad experimental	Tuquerena
3	Ciclo 1	Variedad experimental	Tuquerena
4	Ciclo 2	Variedad experimental	Tuquerena
5	Diente de caballo	Variedad criolla	Rubio
6	INIA S7	Variedad mejorada	INIA
7	CENIAP DMR	Variedad mejorada	CENIAP

### Etapa I: Evaluación Agronómica

#### a. Ubicación del Ensayo

El ensayo fue establecido en la Unidad Académica “La Tuquerena” del municipio Junín, estado Táchira en la época seca del año 2016 (15 de Febrero – 3 de Junio) utilizando para la siembra dos semillas por punto de cada genotipo.

## **b. Condiciones Climáticas**

Las condiciones agroecológicas de esta zona, de acuerdo a los datos registrados por la estación climatológica de Bramon, son las siguientes: precipitación total de 1.413,6mm, distribuida en una época de lluvia entre los meses de abril a noviembre, presentando sus máximas precipitaciones en el mes de junio (164mm). La época seca corresponde a los meses de diciembre a marzo con una precipitación en el mes de enero de 56,9mm. La temperatura media promedio anual es de 22°C. La distribución de precipitación en esta zona es bimodal, con una evapotranspiración que es superada por la precipitación aproximadamente desde el mes de marzo hasta mediados de noviembre (Useche, 2006). La Tuquerena correspondiente al bosque húmedo pre montano, se caracteriza por poseer un clima tropical lluvioso de sabana a 950 msnm en suelo franco arcilloso con pH 5,4 (Martínez *et al.*, 2006).

## **c. Manejo Agronómico**

La preparación del suelo consistió en dos pases de rastra y el uso de surcadora para conformar los camellones dispuesto para la siembra. A partir de los valores obtenidos en el análisis de suelo previo a la intervención del terreno y en comparación con el manejo utilizado por los productores de la zona, se estimaron los requerimientos de fertilizantes, aplicando 2 edáficas durante el desarrollo del cultivo (7 dds - 21dds), 1 aplicación de Urea (50 dds) y 5 foliares (cada 7 días entre los 21 dds y los 50 dds). Edáficas: Se utilizó fórmula completa 10-20-20 a razón de 200 Kg.ha<sup>-1</sup> – Urea: 100 Kg.ha<sup>-1</sup> – Foliares: Master Blend con dosis de 30 g.ha<sup>-1</sup>.

El control de malezas fue manual durante todo el cultivo, destacando el mantenimiento constante durante los primeros 40 días hasta lograr el solapamiento de las hojas de maíz.

Para el control de la principal plaga del cultivo el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) sobre la base del manejo del productor y a juicio de la existencia de agroquímicos en el mercado, se realizaron aplicaciones de insecticidas como Mecarmil, Torpedo y Match con dosis de 2 L.ha<sup>-1</sup>, 1.5 L.ha<sup>-1</sup> y 1 L. ha<sup>-1</sup> respectivamente, iniciando a los 15 dds en

rotación.

### **Diseño Experimental**

Se estableció un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones para la evaluación de los materiales. La unidad experimental estuvo conformada por tres hileras de 5 metros de largo, 0,8 m entre hileras y 0,25 m entre plantas. La siembra fue manual asegurando 2 semillas por hoyo para luego realizar el entresaque estableciendo 1 planta cada 0,25 m, con siete tratamientos por cuatro repeticiones, para un total de 28 unidades experimentales.

### **Variables Evaluadas**

#### **- Variables Agronómicas**

La evaluación de las variables tomadas a continuación fueron realizadas bajo las especificaciones de CIMMYT, (1991) y descriptores propuestos en un programa de Fitomejoramiento participativo en Mesoamérica.

- *Germinación:* Al transcurrir 21 dds se realizó el conteo de las plantas existentes en relación a las sembradas.
- *Altura de la planta (Estado vegetativo):* A los 50 dds tomando 10 plantas al azar se midió en centímetros desde la base del suelo hasta donde inicia la espiga.
- *Altura de la mazorca:* será medido luego de la floración, en centímetros abarcando la distancia desde el suelo hasta el nudo donde se inserta la mazorca más alta de la planta tomando cinco plantas representativas de la parcela para el promedio (CIMMYT, 1991).
- *Acame:* Se realizó el conteo desde los 54 dds de las plantas quebradas de forma general incluyendo aquellas dobladas desde la base y por encima de los 50 cm.
- *Número de días al 50 % de floración masculina:* Se registró la cantidad de días desde la siembra necesarios para alcanzar el 50 % de floración respecto a cada parcela, en este caso con el apareamiento del polen en la espiga.

- *Número de días al 50 % de floración femenina:* Se registró el número de días desde la siembra necesarios para alcanzar el 50 % de floración respecto a cada parcela, en este caso al observar que han emergido los estigmas.
- *Porcentaje de humedad:* Al momento de la cosecha se registró la humedad desgranando 3 mazorcas por parcela, utilizando un medidor de humedad *multi-grain portable* Marca Dickey-Jhon.
- *Longitud de la mazorca:* Se tomó una muestra de 10 mazorcas, midiendo en centímetros su largo que va desde la base hasta la punta.
- *Diámetro de la mazorca:* Considerando el centro se obtuvo el diámetro en centímetros de 10 mazorcas.
- *Peso de la mazorca:* Se tomó en gramos el peso promedio de 10 mazorcas por parcela.
- *Número de granos por hilera:* se contarán en tres hileras para cinco mazorcas por parcela, iniciando el conteo en la base hasta el ápice de la mazorca (Muñoz *et al.*, 1993).
- *Número de hileras por mazorca:* se contará en la parte central de la mazorca evitando la base y la punta, tomando cinco mazorcas por parcela (Muñoz *et al.*, 1993).
- *Diámetro de la tusa:* Se desgranaron 10 mazorcas y se registró el diámetro de la tusa en centímetros, tomando en consideración el centro.
- *Peso de 100 granos:* Tomando 10 mazorcas por parcela, se desgranaron y se registró el peso de 100 granos en gramos.

**Análisis Estadístico**

Para las variables cuantitativas, se llevó a cabo un análisis de estadística descriptiva considerando los valores de mínimo, máximo, media, desviación estándar, asimetría, Kurtosis y Normalidad para observar las tendencias generales y comprobar la normalidad de la distribución de los datos. Una vez verificado los supuesto del análisis de la varianza, para cada variable y cada ensayo se llevó a cabo el análisis de varianza (ANAVAR), haciendo uso de la herramienta estadística INFOSTAT (2011), bajo el diseño de bloques al azar descrito a continuación:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

dónde:

$Y_{ij}$  : Observación del i-ésimo genotipo en el j-ésimo bloque

$\mu$  : Media general

$\tau_i$  : Efecto del i-ésimo genotipo

$\beta_j$ : Efecto del j-ésimo bloque

$\varepsilon_{ij}$ : Error experimental bajo el efecto aleatorio del i-ésimo tratamiento y el j-ésimo bloque

**Hipótesis**

$$H_0: \sigma_{\tau}^2 = 0$$

$$H_0: \sigma_{\beta}^2 = 0$$

$$H_0: \sigma_{\varepsilon}^2 = 0$$

$$H_0: \sigma_{\tau}^2 \neq 0$$

$$H_0: \sigma_{\beta}^2 \neq 0$$

$$H_0: \sigma_{\varepsilon}^2 \neq 0$$

Para cada ensayo el ANAVAR realizado permitió evaluar la significancia estadística de las fuentes de variación genotipos y bloques, cuyas esperanzas de los cuadrados medios se presentan en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Fuentes de variación, Grados de libertad, Suma de cuadrados, Cuadrados medios, Esperanza de los cuadrados medios y prueba de F del análisis de varianza para cada ensayo.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Esperanza de los Cuadrados Medios	Prueba de F
Genotipo	t-1	$\sum_{i=1}^t \frac{Y_i^2}{r} - F.C.$	SCTRAT / (t-1)	$r \sum_{i=1}^t \frac{t_i^2}{t-1} + \sigma_e^2$	CMTRAT/ CMEE
Bloque	r-1	$\sum_{j=1}^t \frac{Y_j^2}{t} - F.C.$	SCBLOQ / (r-1)	$t\sigma_\beta^2 + \sigma_e^2$	CMBLOQ/ CMEE
Error	(t-1)(r-1)	SC TOTAL – SCTRAT - SCBLOQ	SCEE / (t-1)(r-1)	$\sigma_e^2$	
Total	rt-1	$\sum_{i=1}^t Y_{ij}^2 - F.C.$			

donde F.C. =  $(\sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^r Y_{ij})^2 / rt$

Para cada variable se realizó un análisis de regresión lineal, mediante el procesamiento de datos por medio del programa estadístico SAS JMP 7.0.2. Con la media de cada ciclo y variable se calculará el avance genético por ciclo de selección con la fórmula:

$$\Delta G = \frac{b_i}{C_o} 100$$

donde:

$b_i$ : Coeficiente de regresión lineal simple de la media de cada variable sobre el número de ciclos de selección.

## Etapa II: Evaluación Molecular

### Lugar para la evaluación molecular

La ejecución de los dos objetivos se realizó con el apoyo del Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA), Instituto de Genética, Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela y el Laboratorio de Biología Molecular perteneciente a la Fundación DANAC.

### Estudio de Diversidad Genética

#### Material Vegetal

Se evaluaron 8 materiales de maíz utilizando como testigo un parental macho de la Fundación DANAC tal como se muestra en el cuadro 4. De cada tratamiento se tomaron 10 semillas embebidas por 2 días en cápsulas de Petri con papel absorbente humedecido con Agua destilada estéril, sometidas previamente a 4 lavados, iniciando con ADE, luego Etanol al 5% y dos finales de ADE.

**Cuadro 4.** Identificación de los 8 materiales de maíz (*Zea mays*, L) utilizados en el estudio de diversidad genética con marcadores microsatélites SSR.

No.	Código	Genotipo
1	Pg	Progenitor
2	C0	Ciclo 0
3	C1	Ciclo 1
4	C2	Ciclo 2
5	DC	Diente de caballo
6	Cp	INIA S7
7	In	CENIAP DMR
8	M255	Parental Macho DANAC

## Microsatélites (SSR)

Se evaluó un total de 45 marcadores moleculares microsatélites ubicados en los 10 cromosomas del genoma del maíz (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** SSR utilizados para el estudio de diversidad genética de los 8 materiales de maíz (*Zea mays* L.)

No.	SSR	Nombre	Cr	Directo (Sentido)	Indirecto	pb
1	SSR 1	<i>phi109275</i>	1,03	CGG TTC ATG CTA GCT CTG C	GTT GTG GCT GTG GTG GTG	120-140
2	SSR 4	<i>phi011</i>	1,09	TGT TGC TCG GTC ACC ATA CC	GCA CAC ACA CAG GAC GAC AGT	215-230
3	SSR 6	<i>phi227562</i>	1,11	TGA TAA AGC TCA GCC ACA AGG	ATC TCG GCT ACG GCC AGA	307-325
4	SSR 57	<i>phi083</i>	2,04	CAA ACA TCA GCC AGA GAC AAG GAC	ATT CAT CGA CGC GTC ACA GTC TAC T	125-139
5	SSR 16	<i>nc133</i>	2,05	AAT CAA ACA CAC ACC TTG CG	GCA AGG GAA TAA GGT GAC GA	110-115
6	SSR 17	<i>phi453121</i>	3,01	ACC TTG CCT GTC CTT CTT TCT	CAA GCA AGA CTT TTG ATC AGC C	206-224
7	SSR 19	<i>phi029</i>	3,04	TTG TCT TTC TTC CTC CAC AAG CAG CGA A	ATT TCC AGT TGC CAC CGA CGA AGA ACT T	148-162
8	SSR 20	<i>phi053</i>	3,05	CTG CCT CTC AGA TTC AGA GAT TGA C	AAC CCA ACG TAC TCC GGC AG	159-195
9	SSR 21	<i>umc1399</i>	3,07	GCT CTA TGT TAT TCT TCA ATC GGG C	GGT CGG TCG GTA CTC TGC TCT A	115-123
10	SSR 24	<i>phi072</i>	4,01	ACC GTG CAT GAT TAA TTT CTC CAG CCT T	GAC AGC GCG CAA ATG GAT TGA ACT	141-164
11	SSR 66	<i>phi096</i>	4,04	TCC ACC ATT TGA CAC TTA GGC A	GCG TAG GAC GAC CGT TGA A	102-112
12	SSR 54	<i>phi079</i>	4,05	TGG TGC TCG TTG CCA AAT CTA CGA	GCA GTG GTG GTT TCG AAC AGA CAA	180-200
13	SSR 25	<i>phi093</i>	4,08	AGT GCG TCA GCT TCA TCG CCT ACA AG	AGG CCA TGC ATG CTT GCA ACA ATG GAT ACA	282-298
14	SSR 27	<i>phi076</i>	4,11	TTC TTC CGC GGC TTC AAT TTG ACC	GCA TCA GGA CCC GCA GAG TC	161-175
15	SSR 28	<i>nc130</i>	5,00	GCA CAT GAA GAT CCT GCT GA	TGT GGA TGA CGG TGA TGC	139-148
16	SSR 30	<i>phi008</i>	5,03	CGG CTA CGG AGG CGG TG	GAT GGG CCC ACA CAT CAG TC	85-106

17	SSR 31 <i>phi331888</i>	5,03	TTG CGC AAG TTT GTA GCT G	ACT GAA CCG CAT GCC AAC	129-136
18	SSR 33 <i>zct118</i>	5,04	CTT CCA GCC GCA ACC CTC	CCA ACA ACG CGG ACG TGA	115-122
19	SSR 34 <i>umc1153</i>	5,06	CAG CAT CTA TAG CTT GCT TGC ATT	TGG GTT TTG TTT GTT TGT TTG TTG	105-120
20	SSR 35 <i>umc1143</i>	5,07	GAC ACT AGC AAT GTT CAA AAC CCC	CGT GGT GGG ATG CTA TCC TTT	74-84
21	SSR 36 <i>phi423796</i>	5,09	CAC TAC TCG ATC TGA ACC ACC A	CGC TCT GTG AAT TTG CAT GCT C	126-136
22	SSR 40 <i>phi123</i>	6,04	GGA GAC GAG GTG CTA CTT CTT CAA	TGT GGC TGA GGC TAG GAA TCT C	146-150
23	SSR 61 <i>phi031</i>	6,04	GCA ACA GGT TAC ATG AGC TGA CGA	CCA GCG TGC TGT TCC AGT AGT T	185-225
24	SSR 37 <i>phi078</i>	6,05	CAG CAC CAG ACT ACA TGA CGT GTA A	GGG CCG CGA GTG ATG TGA GT	300-308
25	SSR 39 <i>phi070</i>	6,05	GCT GAG CGA TCA GTT CAT CCA G	CCA TGG CAG GGT CTC TCA AG	80-85
26	SSR 43 <i>phi034</i>	6,07	TAG CGA CAG GAT GGC CTC TTC T	GGG GAG CAC GCC TTC GTT CT	113-146
27	SSR 41 <i>phi089</i>	6,08	GAA TTG GGA ACC AGA CCA CCC AA	ATT TCC ATG GAC CAT GCC TCG TG	83-103
28	SSR 44 <i>phi328175</i>	6,08	GGG AAG TGC TCC TTG CAG	CGG TAG GTG AAC GCG GTA	100-130
29	SSR 42 <i>phi112</i>	7,01	TGC CCT GCA GGT TCA CAT TGA	GTAGG AGT ACG CTT GGA TGC TCT TC	136-159
30	SSR 45 <i>phi420701</i>	7,01	GAT GTT TCA AAA CCA CCC AGA	ATG GCA CGA ATA GCA ACA GG	291-297
31	SSR 62 <i>phi091</i>	7,03	ATC TTG CTT CCA TAA GAT GCA CTG CTC T	CTC AGC TTC GGT TCC TAC ACA GT	110-112
32	SSR 48 <i>phi015</i>	7,04	GCA ACG TAC CGT ACC TTT CCG A	ACG CTG CAT TCA ATT ACC GGG AAG	82-102
33	SSR 60 <i>phi116</i>	7,06	GCA TAC GGC CAT GGA TGG GA	TCC CTG CCG GGA CTC CTG	152-175
34	SSR 49 <i>umc1279</i>	8,00	GAT GAG CTT GAC GAC GCC TG	CAA TCC AAT CCG TTG CAG GTC	89-101
35	SSR 64 <i>phi115</i>	8,03	GCT CCG TGT TTC GCC TGA A	ACC ATC ACC TGA ATC CAT CAC A	93-107
36	SSR 47 <i>umc1161</i>	8,06	GGT ACC GCT ACT GCT TGT TAC TGC	GCT CGC TGT TGG TAG CAA GTT TTA	140-152
37	SSR 50 <i>phi032</i>	8,09	CTC CAG CAA GTG ATG CGT GAC	GAC ACC CGG ATC AAT GAT GGA AC	229-261

38	SSR 55 <i>phi042</i>	9,04	ATG TGG CCA TCA TTC AAT GCT GTA GAC	ACA CAT GCA GGT GCA GCC AGA	208
39	SSR 51 <i>phi448880</i>	9,06	CGA TCC GGA GGA GTT CCT TA	CCA TGA ACA TGC CAA TGC	173-191
40	SSR 53 <i>umc1277</i>	9,08	TTT GAG AAC GGA AGC AAG TAC TCC	ACC AAC CAA CCA CTC CCT TTT TAG	130-142
41	SSR 7 <i>phi041</i>	10,00	TTG GCT CCC AGC GCC GCA AA	GAT CCA GAG CGA TTT GAC GGC A	196-204
42	SSR 8 <i>umc1152</i>	10,01	CCG AAG ATA ACC AAA CAA TAA TAG TAG G	ACT GTA CGC CTC CCC TTC TC	155-223
43	SSR 9 <i>phi059</i>	10,02	AAG CTA ATT AAG GCC GGT CAT CCC	TCC GTG TAC TCG GCG GAC TC	145-165
44	SSR 11 <i>umc1061</i>	10,06	AGC AGG AGT ACC CAT GAA AGT CC	TAT CAC AGC ACG AAG CGA TAG ATG	101-110
45	SSR 12 <i>umc1196</i>	10,07	CGT GCT ACT ACT GCT ACA AAG CGA	AGT CGT TCG TGT CTT CCG AAA CT	137-161

## - Metodología

### a. Extracción de ADN

Se utilizó el protocolo descrito por Doley y Doley (1987) modificado por DANAC, a partir de las 10 semillas se maceró con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino colocando 0,1 gr de la mezcla en un microtubo de 1,5 mL, esto para cada tratamiento, luego se adicionó 700uL de Buffer CTAB 2% (Tris-HCl 100mM pH 8.0; NaCl 1,4 M; EDTA 20mM, polietinil-glicol 1% y sulfito de sodio 0,5 %) precalentado en baño seco por 15 minutos adicionando 10 uL de mercaptoetanol, luego se agito vigorosamente para homogeneizar y llevar a incubación a una temperatura de 65°C por una hora agitando en vortex en intervalos de 8 minutos. Al cumplir el tiempo de incubación (1 hora) se dejaron por 5 minutos a temperatura ambiente para luego agregar 600 uL de Cloroformo: Isoamilico (24:1), mezclando las muestras por inversión suavemente de 20 veces, luego se centrifugo a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo, estéril e identificado, tomando 300 uL de sobrenadante. Se agregaron 300 uL de etanol 100% (-20°C), es decir en relación 1:1 sobrenadante, etanol, sellando bien cada microtubo

y dejando por la noche en reposo bajo  $-20^{\circ}\text{C}$ . Luego se centrifugó 700rpm por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los lavados del pellet se iniciaron adicionando 500  $\mu\text{L}$  de Etanol al 70 % a  $4^{\circ}\text{C}$ , se agitó suavemente hasta desprender el pellet y se llevó a centrifuga a 12000 rpm por 7 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , repitiendo el lavado 3 veces, a una temperatura ambiente se dejó secar el pellet para luego resuspenderlo adicionando 100  $\mu\text{L}$  de TE.

### **Cuantificación y calidad de ADN**

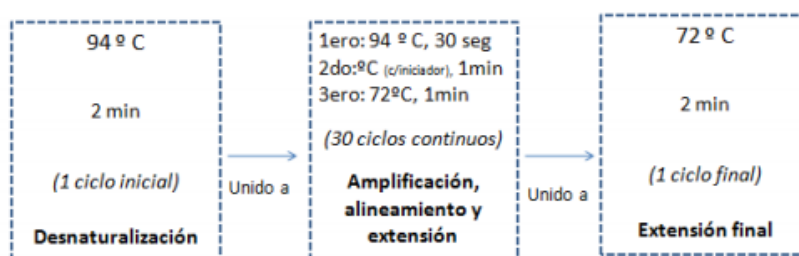
En gel de agarosa al 0,8 % en TBE 0,5 X (Tris-HCl 250mM, ácido bórico 30mM y EDTA 42mM). Se utilizó a diferentes concentraciones el bacteriófago Lambda (25, 50 y 100ng) sirviendo en los pozos 3  $\mu\text{L}$  de ADN y 3  $\mu\text{L}$  de buffer de carga (Azul de bromofenol 0.25% y glicerol en agua al 30 %).

La electroforesis se realizó por 20 minutos a 80 voltios, para luego observar en el trasiluminador de luz UV, estimando visualmente la concentración de ADN en comparación los las diferentes concentraciones servidas del marcador. Para cada muestra según la concentración asignada se llevó a cabo la dilución pertinente para ajustar a 5ng/ $\mu\text{L}$ , necesarias para la reacción de amplificación SSR-PCR.

### **Amplificación SSR-PCR**

Para la reacción de amplificación PCR-SSR se utilizó el método aplicado por Arnao (2003), para un volumen final de 15  $\mu\text{L}$  (5X de tampón para PCR; 25mM MgCl; 2.5 mM de cada dNTP's; 2mM de cada iniciador directo y reverso; 1U de *Taq* polimerasa y 50ng ADN).

La reacción de amplificación se llevó a cabo bajo condiciones controladas en un termociclador C 1000 Touch BIO-RAD con un programa que corresponde los siguientes ciclos:



### Visualización de los productos de amplificación

La visualización de los productos de la PCR-SSR por medio de electroforesis y tinción con nitrato de plata, se utilizará el protocolo de Arnao (2003), en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 6%.

### Tinción de los productos de amplificación

La tinción se realizó con nitrato de plata, siguiendo el protocolo descrito por Arnao (2003) modificado por Fundación DANAC, a continuación:

Tiempo	Etapas	Solución
20'	Fijación	Ácido acético
3' + 3'	Lavado	Agua destilada
30'	Tinción	Nitrato de plata
5''	Lavado	Agua destilada
Hasta observar bandas	Revelado	Carbonato de Sodio
5'	Parada	Ácido acético
3'	Lavado	Agua

### - Genotipado

Para cada material y SSR se asignó un genotipo (dos letras) para aquellas bandas observadas en los geles a través de trasiluminador de luz blanca.

### -Pares de bases (pb)

Se estimó pares de bases a partir de un marcador de pb conocidos (25 pb *Promega*), tomando en cuenta la distancia recorrida por el marcador en centímetros en el gel de poliacrilamida y la distancia recorrida de cada uno de los alelos. Se utilizó las indicaciones, partiendo de una hoja de cálculo Excel basadas en la distancia logarítmica.

### Análisis Molecular

Para la caracterización molecular se utilizará la información de los perfiles electroforéticos visualizados en los geles de poliacrilamida y se construirá una matriz binaria (1 y 0) para ausencia (0) y presencia (1) de bandas, basado en la matriz genotípica elaborada para cada marcador SSR y los materiales.

Mediante el programa Past versión 1.1 y PAST versión 1.42 se calculó la matriz de índices de similitud, basados en la distancia genética de Dice y se obtuvo el dendograma mediante el método jerárquico UPGMA (*unweighted pair group us ingarith metic averages*) para referenciar similitudes y análisis de componentes principales.

Para cada marcador SSR se calculó el coeficiente de Nei (1972) para estimar la distancia genética por medio de:

$$d_i = - \ln \frac{k(X_{ki}X_{kj})}{kX_{ki}^2 X_{kj}^2}$$

donde:  $d_{ij}$  es el coeficiente de distancia entre el par de líneas i y j,  $X_{ki}$ : frecuencia del alelo k en la línea i, y  $X_{kj}$ : frecuencia del alelo k en la línea j.

En la medición de la capacidad discriminatoria de los *loci* microsatélites se utilizó el

parámetro PIC (Contenido de información polimórfica) mediante la fórmula (Liu, 1998):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^N p_i^2$$

donde N: número de alelos observados y pi: frecuencia alélica del i-ésimo alelo.

## Estudio de poblaciones

### Material Vegetal

Se evaluaron dos ciclos del programa de selección recurrente de medios hermanos, para los cuales se tomaron muestras del tejido de la hoja más joven en el ensayo establecido en campo para el estudio de avance genético, colectando un total de 100 muestras por cada ciclo (ciclo 1 y ciclo 2). Destacando que al momento de realizar los ensayos en laboratorio las muestras de tejido vegetal tenían aproximadamente 70 días de colecta.

### Microsatélites SSR

Se evaluó el marcador microsatélite SSR 4 (*phi 011*) polimorfismo para ciclo 1 y ciclo 2, con las siguientes descripciones:

SSR	Nombre	Cr	Directo (Sentido)	Indirecto	Motivo Repetido	pb
SSR 4	<i>phi011</i>	1,09	TGT TGC TCG GTC ACC ATA CC	GCA CAC ACA CAG GAC GAC AGT	AGC	215-230

### - Metodología

#### a. Extracción de ADN

Se utilizó el protocolo descrito por Doley y Doley (1987) modificado por DANAC y bajo supervisión técnica se ajustaron algunos procedimientos para lograr con eficiencia la extracción de ADN a partir de tejido viejo.

Se colocaron 0,5g de la muestra de tejido de cada individuo en microtubos de 1,5 mL que contenía 700 uL de Buffer CTAB 2% (Tris-HCl 100mM pH 8.0; NaCl 1,4 M; EDTA 20mM, polietinil-glicol 1% y sulfito de sodio 0,5 %) y 10 uL de mercaptoetanol precalentado a

65°C. Con la técnica de macerado con balines en el Mini Beadbeater marca BIOSPEC se macero por 3 minutos. Luego se agito vigorosamente para homogeneizar y llevar a incubación a una temperatura de 65°C por una hora agitando en vortex en intervalos de 15 minutos, hasta cumplir con 1 hora y 30 minutos. Al cumplir el tiempo de incubación se dejaron por 5 minutos a temperatura ambiente para luego agregar 600 uL de Cloroformo: Isoamilico (24:1), mezclando las muestras por inversión suavemente de 20 veces, luego se centrifugo a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo, estéril e identificado, tomando 300 uL de sobrenadante. Se agregaron 300 uL de etanol 100% (-20°C), es decir en relación 1:1 sobrenadante, etanol, sellando bien cada microtubo y dejando por la noche en reposo bajo -20°C. Luego se centrifugó 700rpm por 5 minutos a 4 °C. Los lavados del pellet se iniciaron adicionando 500 uL de Etanol al 70 % a 4°C, se agitó suavemente hasta desprender el pellet y se llevó a centrifuga a 12000 rpm por 7 min a 4°C, repitiendo el lavado 3 veces, a una temperatura ambiente se dejó secar el pellet para luego resuspenderlo adicionando 100 uL de TE.

### **Cuantificación y calidad de ADN, Amplificación SSR-PCR, Visualización y Tinción de los productos de Amplificación**

Estos pasos se llevaron a cabo bajo las indicaciones descritas con anterioridad para el estudio de diversidad genética.

#### **c. Análisis Molecular**

Para la caracterización molecular se utilizó la información de los perfiles electroforéticos visualizados en los geles de poliacrilamida y se construirá una matriz binaria (1 y 0) para ausencia (0) y presencia (1) de bandas, basado en la matriz genotípica elaborada para cada marcador SSR y los materiales.

Mediante el programa InfoStat versión 1.1 y PAST versión 1.42 se calculará la matriz de índices de similaridad, basados en la distancia genética de Dice y se obtuvo el dendograma mediante el método jerárquico UPGMA (*unweighted pair group us ingarith metic averages*) para referenciar similitudes y análisis de componentes principales.

Para cada marcador SSR se calculó el coeficiente de Nei (1972) para estimar la distancia genética por medio de:

$$d_i = -\ln \frac{k(X_{ki}X_{kj})}{kX_{ki}^2 X_{kj}^2}$$

donde:  $d_{ij}$  es el coeficiente de distancia entre el par de líneas i y j,  $X_{ki}$ : frecuencia del alelo k en la línea i, y  $X_{kj}$ : frecuencia del alelo k en la línea j.

En la medición de la capacidad discriminatoria de los *loci* microsatelitales se utilizó el parámetro PIC (Contenido de Información Polimórfica) mediante la fórmula (Liu, 1998):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^N p_i^2$$

donde N: número de alelos observados y  $p_i$ : frecuencia alélica del i-ésimo alelo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Etapa I. Evaluación Agronómica

#### - Establecimiento del ensayo

Para evaluar el establecimiento del ensayo se determinó el porcentaje de germinación a los 21 días después de la siembra para los 7 genotipos, destacando que los materiales Progenitor y Ciclo 0 se descartaron de la evaluación agronómica por presentar un porcentaje de emergencia menor a 10 %, tal como lo indica el Cuadro 6. Por el contrario, los cinco genotipos restantes presentaron valores óptimos de germinación, entre un rango de 70 al 85%. Es importante resaltar, que el material conservado por los encargados del programa de mejoramiento, fue limitado, motivo por el cual no se contaba con semilla adicional para establecer un nuevo ensayo.

Vargas *et al.*, (2016) estudiaron la producción y calidad de semillas de maíz obteniendo porcentajes de germinación entre 84 y 96%, haciendo énfasis en las normas de certificación que señalan un porcentaje superior al 85%, por lo cual los valores obtenidos en el presente ensayo (Cuadro n) indican la efectividad en el establecimiento del ensayo que permitió analizar de manera adecuada las variables de campo propuestas.

**Cuadro 6.** Porcentaje de germinación a los 21 después de la siembra para cada genotipo.

<b>No.</b>	<b>Genotipo</b>	<b>% de emergencia</b>
1	Progenitor	<b>0</b>
2	Ciclo 0	<b>6</b>
	Ciclo 1	<b>70</b>
4	Ciclo 2	<b>85</b>
5	Diente de caballo	<b>80</b>
6	INIA S7	<b>70</b>
7	CENIAP DMR	<b>67</b>

## - Variables Agronómicas

### a. Estadística Descriptiva

Para las variables morfológicas, de rendimiento y sus componentes se indican los valores promedio y la estadística descriptiva en el Cuadro 7.

#### - Altura de planta y mazorca:

La altura de planta y de mazorca presentó la mayor dispersión de datos respecto al resto de variables morfológicas, por sus valores más altos de desviación estándar. La altura de planta presentó una media de 147,32 cm y valores mínimos y máximos de 124,50 a 167,40 cm. El valor promedio de la altura de mazorca fue 95,73 cm, un mínimo de 77 y máximo de 117,50 cm.

#### - Acame:

La media fue de 8,05 %, con una desviación estándar de 9,05, presentando una asimetría de 1,14 y un valor de kurtosis negativo. No se presentaron problemas de acame, al observar los datos obtenidos de las variables altura de planta y altura de mazorca se influye que los materiales evaluados no fueron plantas muy altas, característica que posiblemente influyó en el porcentaje de acame con un mínimo de 0% y un valor máximo de 29,03%.

#### - Floración masculina y femenina:

Vargas *et al.*, (2014) definen las plantas con menos de 78 días de floración en el grupo de precocidad, por lo cual los valores de floración de los siete genotipos se ajustan a esta característica, donde la floración masculina y femenina se ubicó cerca de los 64 días, con mínimos de 62 y máximo de 67 días para ambos, presentándose también sincronía floral que es una variable importante para denotar la adaptabilidad de los materiales.

La floración masculina y femenina presentó valores mínimos de 62 días y máximo de 67 días, ambas con kurtosis negativa. La desviación estándar para estas dos variables fue de 1,95.

En general para las variables morfológicas es posible observar que los datos no están agrupados alrededor de la media al presentar valores de asimetría cercanos a cero a excepción del % de acame que indica que la mayoría de sus datos se agrupan por debajo de la media. Respecto a la kurtosis todas presentaron valores negativos asociados con una distribución de tipo platicúrtica, donde es menor la concentración de los datos alrededor de la media.

- Longitud y diámetro de la mazorca:

Se observaron valores de media en longitud de mazorca, diámetro de la mazorca de 15,72 y 4,46 respectivamente. Los valores mínimos fueron de 12, 56 y 4,09 y máximos de 18,91 y 4,90. Ambas variables presentaron valores de asimetría positivos (dextrógiro) más cercanos a cero, señalando la no agrupación de los datos alrededor de la media y una kurtosis negativa. La desviación estándar para longitud de mazorca fue de 1,64 y para diámetro de mazorca fue de 0,23.

- Peso de la mazorca:

Los valores mínimos y máximos del peso total de la mazorca fueron 124,35 y 252,50 gr, respectivamente; y una media de 186,93 gr. Esta variable presentó un valor de desviación estándar de 33,36 definiendo este rango como dispersión de sus datos. Una asimetría de 0,12 y una kurtosis negativa de -0,62.

- Granos por hilera e hileras por mazorca:

Sus valores mínimos y máximos oscilaron entre 20,4 a 33 y 11,1 a 14,20 respectivamente con medias de 27,67 y 12,59. La desviación estándar fue de 3,48 para granos por hilera y de 0,99 para hileras por mazorca. Los valores de asimetría fueron negativos (levógiro) con datos de media más alejados de cero. Y una kurtosis negativa de tipo leptocúrtica

concentrando sus datos alrededor de la media.

- Diámetro de la tusa:

El valor de la media para el diámetro de la tusa fue de 3,08 con una desviación estándar de 0,31, sus valores oscilaron entre 2,60 y 3,90. La asimetría fue positiva de 0,66 y una kurtosis positiva de 0,62.

- Rendimiento:

El rendimiento expresado en  $\text{Kg.ha}^{-1}$  presento un valor de media de 6.726,30 con una desviación de 1417,14. Un valor mínimo de 4500 y un máximo de 9649,29  $\text{Kg.ha}^{-1}$ . La asimetría fue positiva de 0,56 y una kurtosis negativa describiendo una distribución platicúrtica.

Todas las variables evaluadas presentaron normalidad, exceptuando floración masculina y femenina y % de acame.

**Cuadro 7.** Estadística descriptiva para las variables altura de la planta (AP), altura de la mazorca (AM), porcentaje de acame (A), floración masculina (FM), floración femenina (FF), longitud de la mazorca (LM), diámetro de la mazorca (DM), peso de la mazorca (PM), granos por hilera (GH), hileras por mazorca (HM), diámetro de la tusa (DT), peso de 100 granos (P100G), rendimiento (R).

	Variable	Media	D.E.	Min	Max	Asimetría	Kurtosis	Normalidad
Morfológica	AP	147,32	12,31	124,50	167,40	-0,45	-0,91	0,91
	AM	95,73	10,92	77,00	117,50	0,29	-0,84	0,95
	A	8,05	9,05	0,00	29,03	1,14	-0,27	0,79
	FM	64,30	1,95	62,00	67,00	0,10	-1,45	0,82
	FF	64,65	1,95	62,00	67,00	-0,16	-1,34	0,80
Rendimiento y sus componentes	LM	15,72	1,64	12,56	18,91	0,24	-0,37	0,97
	DM	4,46	0,23	4,09	4,90	0,06	-0,92	0,93
	PM	186,93	33,36	124,35	252,50	0,12	-0,62	0,96
	GH	27,67	3,48	20,40	33,00	-0,24	-0,35	0,94
	HM	12,59	0,99	11,10	14,20	-0,01	-1,24	0,91
	DT	3,08	0,31	2,60	3,90	0,66	0,62	0,96
	R	6726,30	1417,14	4500	9649,29	0,56	-0,89	0,90

### b. Análisis de Varianza

En el cuadro 8 y 9 se observa el porcentaje de coeficiente de variación (% CV) para las variables morfológicas oscila entre 1.51 y 5.13 y para el rendimiento y sus componentes el rango % CV se ubicó entre 4.35 y 20.24

**Cuadro 8.** Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables altura de planta (AP), altura de mazorca (AM), floración masculina (FM), floración femenina (FF).

<b>Fuente de variación</b>	<b>gl</b>	<b>AP</b>	<b>AM</b>	<b>FM</b>	<b>FF</b>
<b>Modelo</b>	<b>7</b>	313,44	295,28	8,63	8,72
<b>Bloque</b>	<b>3</b>	338,89*	89,21*	14,73**	16,58**
<b>Genotipo</b>	<b>4</b>	294,34*	449,83**	4,05*	2,83ns
<b>Error</b>	<b>12</b>	57,18	16,44	0,98	0,96
<b>Total</b>	<b>19</b>				
<b>CV</b>		5.13	4.24	1.54	1.51
<b>R<sup>2</sup> Aj</b>		0,62	0,86	0,74	0,75

\* y \*\*: significativo para  $\alpha=0.05$  y  $0.01$ , respectivamente

#### Altura de planta (AP)

Acosta *et al.*, (2013) obtienen promedios de plantas con valores de 245 cm, considerándose materiales muy altos. Por el contrario los genotipos evaluados se ubican en alturas inferiores al promedio de plantas de maíz. En el caso de las variedades mejoradas CENIAP DMR e INIA S7 se induce que estos valores fueron reducidos en comparación a su comportamiento normal, ya que son materiales adaptados a zonas maiceras con características ambientales diferentes a las enfrentadas en el ensayo.

Para altura de planta se presentaron diferencias significativas ( $p<0,05$ ). En el Cuadro 10 se presenta la prueba de comparación de medias de Duncan donde es posible observar 2 grupos, y se destaca Ciclo 2 y diente de caballo con diferencias significativas.

### Altura de mazorca (AM)

La altura de la inserción de la mazorca se ubicó en valores desde 87,25 a 109,50 cm, presentando diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Los datos obtenidos para el material CENIAP DMR coinciden con los valores de Segovia y Alfaro (1995) quienes evaluaron esta variedad en el estado Guárico, con un promedio de 98 cm.

### Floración masculina (FM)

En la prueba de comparación de medias de Duncan, se agrupan todos los genotipos con una tendencia para ciclo 2 con el valor más bajo de días a floración masculina intuyendo que por efecto de la selección se logra un material un poco más precoz en comparación con los otros materiales.

### Floración femenina (FF)

Al igual que la floración masculina, existe la tendencia menores días de floración femenina ubicada para Ciclo 2 con una media de 63.50. Con estos valores de floración femenina y masculina, se observa una sincronía floral, donde ocurre la receptividad de los estigmas y la maduración el polen en periodos semejantes, asegurando así una mayor polinización (Gómez y Rodríguez, 2001).

**Cuadro 9.** Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables longitud de mazorca (LM), diámetro de la mazorca (DM), peso total de la mazorca (PM), granos por hilera (GH), hileras por mazorca (HM), diámetro de la tusa (DT), peso de 100 granos (P100G), rendimiento Kg.ha<sup>-1</sup> (R).

Fuente de variación	gl	LM	DM	PM	GH	HM	DT	R
<b>Modelo</b>	<b>7</b>	3	0,08	995,92	19,64	1,86	0,11	2273754,61
<b>Bloque</b>	<b>3</b>	0,98ns	0,04ns	348,78ns	8,48ns	0,02ns	0,06ns	3548827,15ns
<b>Genotipo</b>	<b>4</b>	4,52ns	0,11ns	1481,27ns	28*	3,24**	0,14ns	1317450,21ns
<b>Error</b>	<b>12</b>	2,49	0,04	1181,18	7,70	0,47	0,09	1853427,02
<b>Total</b>	<b>19</b>							
<b>CV</b>		<b>10,3</b>	<b>4,35</b>	<b>18,39</b>	<b>10,03</b>	<b>5,47</b>	<b>9,65</b>	<b>20,24</b>
<b>R<sup>2</sup>Aj</b>		<b>0,07</b>	<b>0,30</b>	<b>0,00</b>	<b>0,36</b>	<b>0,52</b>	<b>0,07</b>	<b>0,08</b>

\* y \*\*: significativo para  $\alpha = 0.05$  y  $0.01$ , respectivamente

#### Longitud de la mazorca

No se observaron diferencias significativas para esta variable, el porcentaje de coeficiente de variación fue de 10.3. Segovia y Alfaro (1995) evaluaron materiales de maíz donde coinciden al no obtener diferencias significativas para longitud de mazorca con valores promedio de 17,7 cm cercano al valor de la media de esta investigación que fue de 15,72 cm.

#### Diámetro de la mazorca

Se obtuvo un porcentaje de coeficiente de variación de 4,35, entre los genotipos no se presentaron diferencias significativas coincidiendo con Borbor (2013) al analizar esta variable tampoco encontraron diferencias significativas.

### Granos por hilera (GH)

Esta variable según Perdomo, (2012) viene determinado por la longitud de la mazorca. El coeficiente de variación fue de 10,03, presentando diferencias significativas entre los genotipos, siendo INIA S7 el material con mayor cantidad de granos por hilera. El valor promedio es de 27.67 y para las variedades estudiadas por Perdomo (2012) fue de 30.94, valor cercano entre ambas investigaciones (Cuadro 9).

### Hileras por mazorca (HM)

Se presentó diferencias significativas entre los genotipos para la variable hileras por mazorca, con un coeficiente de variación de 5.47 (Cuadro 9). En el cuadro 11 un tendencia al mayor número de hileras por mazorca para INIA S7, con un valor de 13.65 coincidiendo con el obtenido por González et al., (2015) que fue de 13.9.

### Rendimiento (R)

No se observaron diferencias significativas para rendimiento, el coeficiente de variación fue de 20,24. El valor promedio de esta variable fue de 6.726,30 kg.ha<sup>-1</sup> encontrándose dentro del rango obtenido por Quiroz y Marín, (2003) que al evaluar el rendimiento del maíz en diferentes tratamientos obtienen promedios que van desde 6.938 a 7.665 kg.ha<sup>-1</sup> sin presentar diferencias significativas.

**Cuadro 10.** Prueba de comparación entre medias de Duncan para las variables altura de planta (AP), altura de mazorca (AM), floración masculina (FM), floración femenina (FF) para los 5 genotipos.

<b>Genotipo</b>	<b>AP</b>	<b>AM</b>	<b>FM</b>	<b>FF</b>
<b>Ciclo 1</b>	153,35 AB	104,88 A	64,25 AB	64,75 AB
<b>Ciclo 2</b>	157,80 A	109,50 A	62,75 B	63,50 B
<b>Diente de caballo</b>	136,25 C	88,25 B	64,75 A	65,00 AB
<b>INIA S7</b>	146,93 ABC	87,25 B	65,50 A	65,75 A
<b>CENIAP DMR</b>	142,28 BC	88,75 B	64,25 AB	64,25 AB

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ ).

**Cuadro 11.** Prueba de comparación entre medias de Duncan para las variables granos por hilera (GH), hileras por mazorca (HM), peso de 100 granos (P100G) para los 5 genotipos.

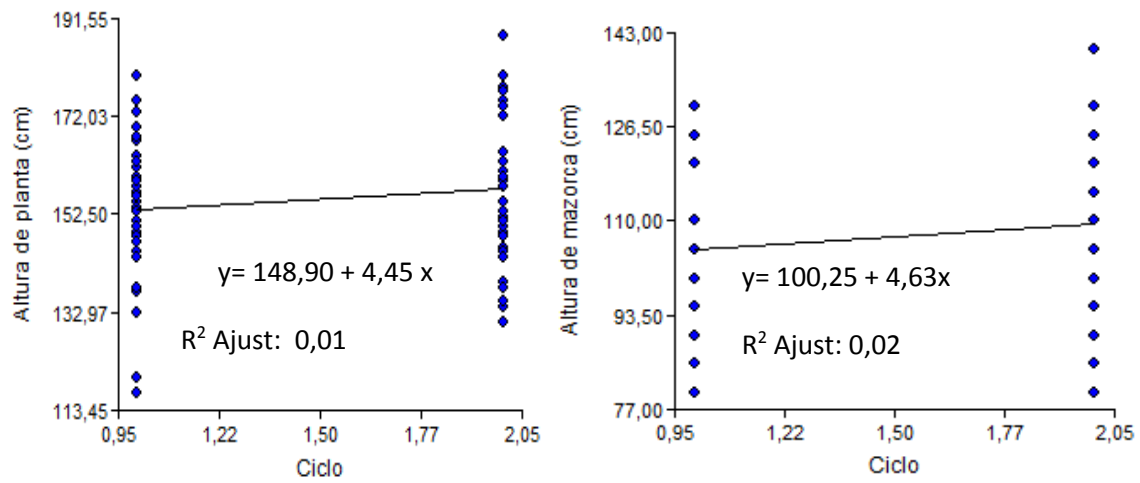
<b>Genotipo</b>	<b>GH</b>	<b>HM</b>	<b>P100G</b>
<b>Ciclo 1</b>	26,25 B	11,36 C	153,26 A
<b>Ciclo 2</b>	24,93 B	12,04 BC	175,07 AB
<b>Diente de caballo</b>	26,35 B	13,10 AB	200,99 BC
<b>INIA S7</b>	31,35 A	13,65 A	199,95 BC
<b>CENIAP DMR</b>	29,45 AB	12,78 AB	221,43 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ )

**Estimación del avance genético para características morfológicas.**

- Altura de planta y altura de mazorca

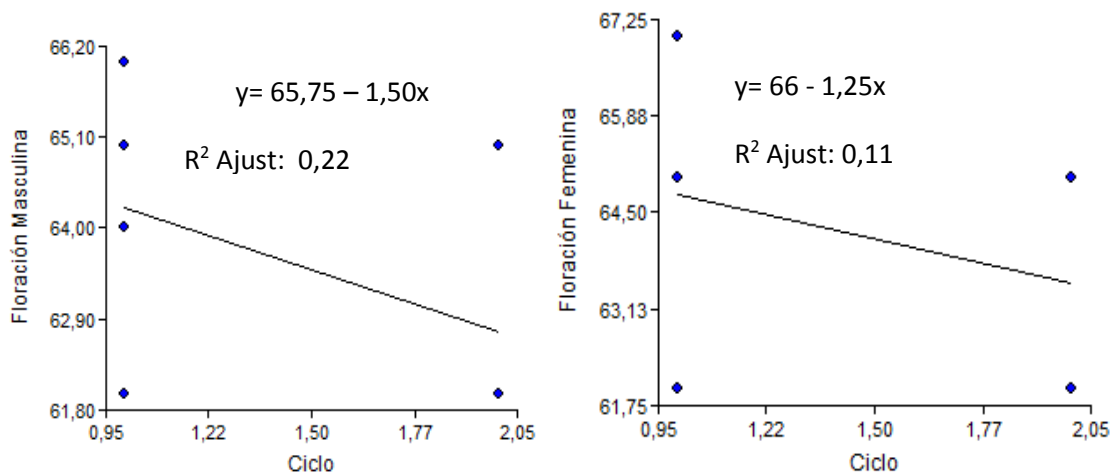
En la figura 1 muestran valores de proyección lineal en aumento para altura de planta y altura de mazorca mostrando una ganancia de 4,45 y 4,63 cm respectivamente desde ciclo 1 a ciclo 2.



**Figura 1.** Regresiones de la altura de planta y altura de mazorca con relación a las variedades experimentales Ciclo 1 y Ciclo 2.

- Floración masculina y Floración femenina

La influencia de la selección se ve expresada en la proyección lineal (Figura 2), donde la floración masculina y femenina se da en un proceso más precoz al comparar ciclo 1 y ciclo 2.



**Figura 2.** Regresiones de la floración masculina y floración femenina con relación a las variedades experimentales Ciclo 1 y Ciclo 2.

Ramírez *et al.*, (2000) destacan la correlación positiva que existe entre el rendimiento con la altura de planta y los días a floración, por lo cual se induce que al disminuir estas variables se haya influenciado en la reducción del rendimiento.

## **Etapa II: Evaluación Molecular**

### **Extracción ADN**

El material vegetal utilizado fueron: Progenitor, Ciclo 0, Ciclo 1, Ciclo 2, Diente de Caballo, INIAS7 y Ceniap DMR, para un total de ocho genotipos. Cabe destacar que la extracción del ADN se realizó ajustando y estandarizando la metodología de obtención del ADN (Cuadro 12). En el caso de las semillas se realizó la colocación de las semillas en agua destilada estéril para su imbibición por dos días.

Para la extracción del ADN de los dos ciclos de variedades experimentales de la Universidad Nacional Experimental del Táchira se partió de muestras vegetales recolectadas en el Campo Experimental de Tuquerena (Rubio, Estado Táchira) desde el diseño experimental para evaluación de variables agronómicas, destacando que al momento de la extracción de ADN estas muestras de tejido vegetal tenían 70 días aproximadamente después de su colecta.

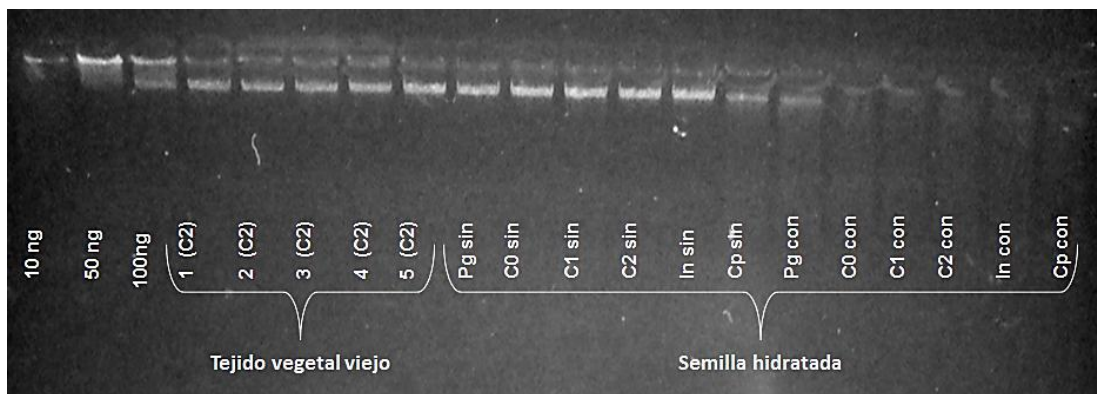
Por esta razón la metodología utilizada para la extracción de ADN desde el protocolo descrito por Doley y Doley (1987) modificado por DANAC, se ajustó para cada objetivo en función de la procedencia de la muestra después de varias pruebas (Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Comparación de Método de Extracción de ADN para muestras de procedencia de semilla hidratada y tejido vegetal viejo.

<b>Etapas</b>	<b>DANAC *</b>	<b>Semilla hidratada</b>	<b>Tejido vegetal viejo</b>
Muestra	Tejido vegetal joven	Semilla imbibida	Tejido vegetal viejo
Macerado	Nitrógeno Líquido en mortero	Nitrógeno Líquido en mortero	Con balines en macerador mecánico
2-Mercaptoetanol 1,4%	Adición 10 µL	Sin adición	Adición µL
Pre calentamiento del tampón de lisis	No aplica	A 65 °C	A 65°C
Incubación 65°C	30 minutos/agitación cada 8 minutos	60 minutos/agitación cada 8 minutos	90 minutos/agitación cada 15 minutos
Centrifugado	12000 rpm por 7 min/4°C	13000 rpm por 10 min/4°C	13000 rpm por 10 min/4°C
Volumen del sobrenadante	200 µL	300 µL	300 µL

\*Doley y Doley (1987), con modificaciones.

En la Figura 3 se observa el resultado final para las dos modificaciones desde las muestras de tejido vegetal viejo y semilla hidratada, destacando la definición y el ajuste de la metodología, tal como resaltan López y Mejía, (2012) mencionando la importancia del protocolo de extracción de ácidos nucleicos, la pureza y la calidad de ADN como variables necesarias para llevar a cabo una PCR eficiente.



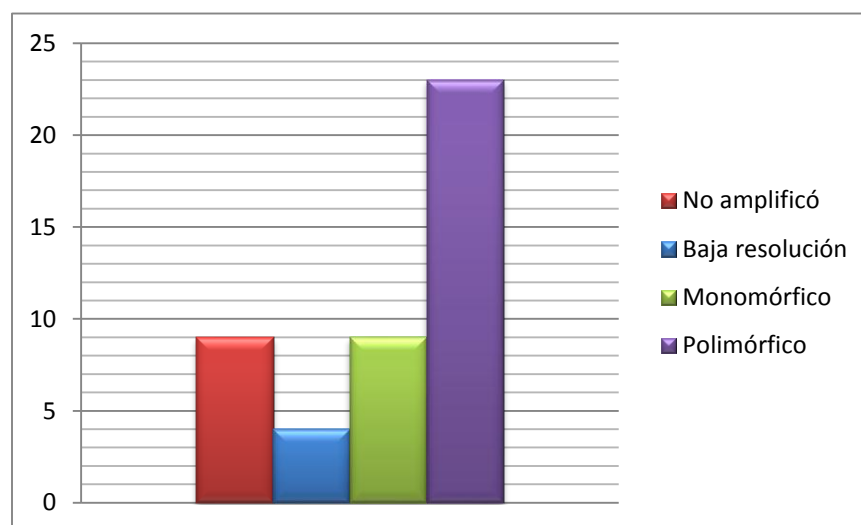
**Figura 3.** Comparación de protocolo de extracción de ADN modificado a partir de muestras de procedencia de semilla hidratada y tejido vegetal viejo. (1,2,3,4,5: Tejido vegetal viejo de población Ciclo 2; **Pg**: progenitor; **C0**: Ciclo 0; **C1**: Ciclo1; **C2**: Ciclo 2; **In**: Inia S7; **Sin**: Sin mercaptoetanol; **Con**: Con mercaptoetanol).

La calidad de ADN de ambos objetivos se verificó en gel de electroforesis tal como se muestra en la figura 1. La concentración de ADN obtenida para el estudio de diversidad genética estuvo comprendida entre 150 - 200 ng.µL<sup>-1</sup>. Para riqueza alélica y uniformidad alélica la concentración de ADN mantuvo un rango de 80 - 120 ng.µL<sup>-1</sup>.

En la comparación de estos tres métodos y al observar los resultados, se destaca el uso de balines en macerador mecánico, el cual permitió avanzar de forma eficiente el proceso de lisis, donde en periodos cortos de tiempo (en este caso 2-3 minutos) se obtuvo la mayor cantidad de muestras con mezclas homogéneas que permitieron obtener concentraciones más altas de ADN.

### 1. Estudio de Diversidad Genética

En el análisis de polimorfismo se evaluaron 45 marcadores tipo microsatélites dentro de los cuales 9 no amplificaron, 4 presentaron problemas de resolución, 9 fueron monomórficos y 23 polimórficos (Figura 4).



**Figura 4.** Evaluación de 45 marcadores tipo microsatélites en 8 materiales de maíz.

Los SSR polimórficos amplificaron un total de 73 alelos con un promedio de alelos por locus de 2,28, siendo valores aproximados a los obtenidos por Perdomo (2012) donde evaluaron 31 marcadores SSR para 11 cultivares de maíz liberados por Fundación DANAC,

entre ellos cinco variedades y seis híbridos presentado 76 alelos y un promedio de 2,45 alelos por locus.

Para el estudio de diversidad con los 23 SSR polimórficos se obtuvo un valor promedio del contenido de información polimórfica (PIC) de 0,48, oscilando su valor mínimo en 0,22 y 0,24 (*phi448880* y *umc1061*) y el máximo en 0,70 y 072 (*nc133* y *phi015*) (Cuadro 13). Perdomo (2012), reportó una media de 0,52 valor muy cercano al señalado en esta investigación, coincidiendo con el dato de microsatélite *umc1061* indicado como el rango mínimo de PIC en comparación con el resto de SSR.

**Cuadro 13.** Valores de contenido de información polimórfica (PIC) obtenidos en el presente estudio para los 23 marcadores SSR.

<i>SSR</i>	<i>Nombre</i>	<i>PIC</i>
<b>SSR 1</b>	<i>phi109275</i>	0,69
<b>SSR 4</b>	<i>phi011</i>	0,50
<b>SSR 16</b>	<i>nc133</i>	0,70
<b>SSR 19</b>	<i>phi029</i>	0,28
<b>SSR 20</b>	<i>phi053</i>	0,51
<b>SSR 24</b>	<i>phi072</i>	0,47
<b>SSR 54</b>	<i>phi079</i>	0,46
<b>SSR 25</b>	<i>phi093</i>	0,41
<b>SSR 27</b>	<i>phi076</i>	0,55
<b>SSR 30</b>	<i>phi008</i>	0,34
<b>SSR 31</b>	<i>phi331888</i>	0,47
<b>SSR 34</b>	<i>umc1153</i>	0,55
<b>SSR 39</b>	<i>phi070</i>	0,49
<b>SSR 43</b>	<i>phi034</i>	0,50
<b>SSR 44</b>	<i>phi328175</i>	0,50
<b>SSR 48</b>	<i>phi015</i>	0,72
<b>SSR 49</b>	<i>umc1279</i>	0,62
<b>SSR 51</b>	<i>phi448880</i>	0,22
<b>SSR 53</b>	<i>umc1277</i>	0,30
<b>SSR 7</b>	<i>phi041</i>	0,48
<b>SSR 8</b>	<i>umc1152</i>	0,46
<b>SSR 9</b>	<i>phi059</i>	0,47
<b>SSR 11</b>	<i>umc1061</i>	0,24
<b>Promedio PIC</b>		<b>0,48</b>

El número total de bandas generadas en esta investigación fue de 73 (Cuadro 14), incluido en el valor que obtienen Salami *et al.*, (2016) al realizar un estudio de diversidad genética con tres SSR para 222 materiales de maíz y señalan una media de 76 bandas con un mínimo de 58 y máximo de 102.

El tamaño de las regiones SSR amplificadas se encontraron entre 43 y 318 pb, el marcador con pb menor fue el *phi070* amplificando 3 alelos en un tamaño de 43 a 68 pb, y el mayor fue *umc1277* con 2 alelos y un tamaño 307 a 318 pb.

**Cuadro 14.** Número de alelos y tamaño (pb) obtenidos para 32 SSR amplificados con los 8 materiales de maíz.

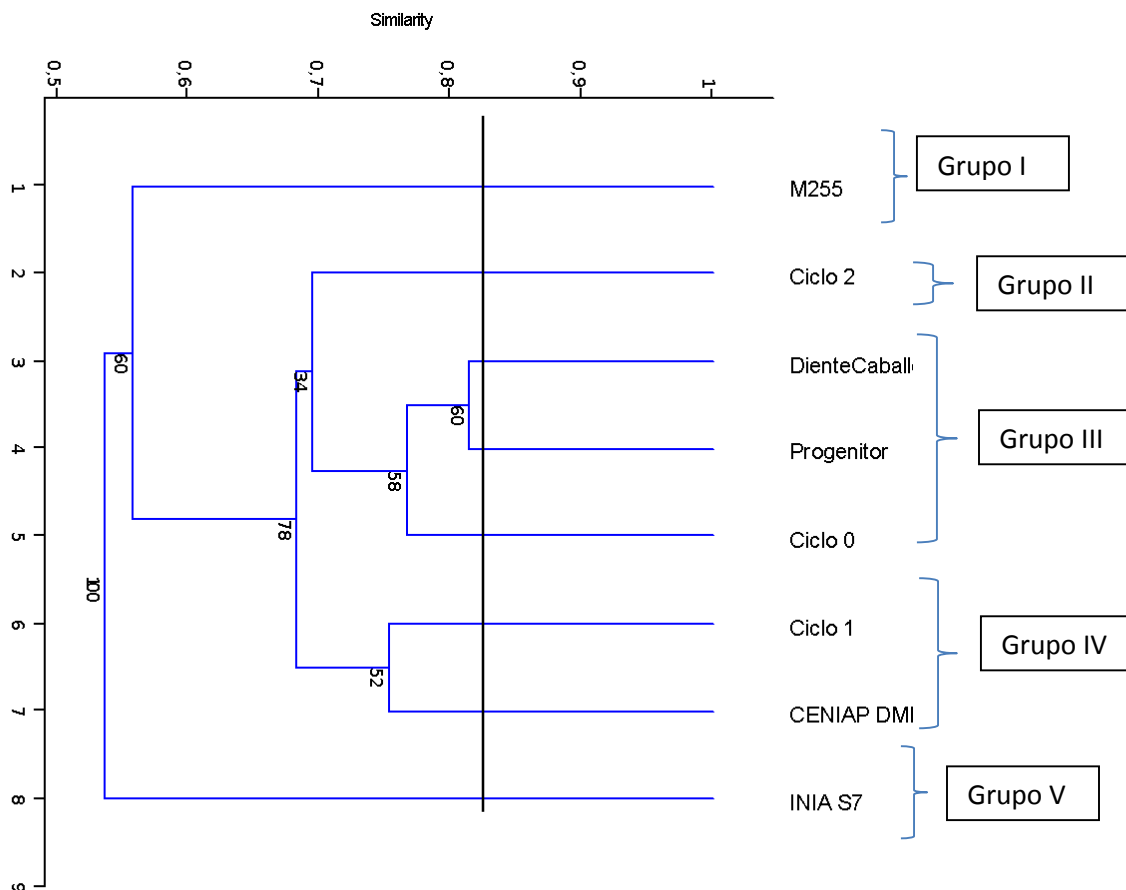
<b>No.</b>	<b>SSR</b>	<b>Nombre</b>	<b>Número de alelos</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
<b>1</b>	SSR 1	<i>phi109275</i>	4 alelos	116-150
<b>2</b>	SSR 4	<i>phi011</i>	3 alelos	91-122
<b>3</b>	SSR 6	<i>phi227562</i>	1 alelo	287
<b>4</b>	SSR 16	<i>nc133</i>	4 alelos	103-129
<b>5</b>	SSR 19	<i>phi029</i>	2 alelos	113-137
<b>6</b>	SSR 20	<i>phi053</i>	3 alelos	172-210
<b>7</b>	SSR 24	<i>phi072</i>	2 alelos	143-172
<b>8</b>	SSR 66	<i>phi096</i>	1 alelo	149
<b>9</b>	SSR 54	<i>phi079</i>	4 alelos	133-159
<b>10</b>	SSR 25	<i>phi093</i>	3 alelos	195-222
<b>11</b>	SSR 27	<i>phi076</i>	3 alelos	120-149
<b>12</b>	SSR 28	<i>nc130</i>	1 alelo	167
<b>13</b>	SSR 30	<i>phi008</i>	3 alelos	163-187
<b>14</b>	SSR 31	<i>phi331888</i>	2 alelos	119-145
<b>15</b>	SSR 34	<i>umc1153</i>	3 alelos	84-120
<b>16</b>	SSR 36	<i>phi423796</i>	1 alelo	124
<b>17</b>	SSR 40	<i>phi123</i>	1 alelo	169
<b>18</b>	SSR 61	<i>phi031</i>	1 alelo	213
<b>19</b>	SSR 39	<i>phi070</i>	3 alelos	43-68
<b>20</b>	SSR 43	<i>phi034</i>	2 alelos	149-182
<b>21</b>	SSR 44	<i>phi328175</i>	3 alelos	138-169
<b>22</b>	SSR 42	<i>phi112</i>	1 alelo	148
<b>23</b>	SSR 48	<i>phi015</i>	4 alelos	59-104

<b>24</b>	SSR 60	<i>phi116</i>	1 alelo	143
<b>25</b>	SSR 49	<i>umc1279</i>	3 alelos	61-100
<b>26</b>	SSR 47	<i>umc1161</i>	2 alelos	166-187
<b>27</b>	SSR 50	<i>phi032</i>	1 alelo	182
<b>28</b>	SSR 51	<i>phi448880</i>	2 alelos	195-222
<b>29</b>	SSR 53	<i>umc1277</i>	2 alelos	307-318
<b>30</b>	SSR 7	<i>phi041</i>	3 alelos	113-120
<b>31</b>	SSR 8	<i>umc1152</i>	2 alelos	174-193
<b>32</b>	SSR 9	<i>phi059</i>	2 alelos	163-184
<b>No de alelos promedio/locus</b>			<b>2,28</b>	
<b>Total de alelos</b>			<b>73</b>	

En función del índice de similaridad y distancia de Dice (Cuadro 16), se generó el dendograma UPGMA, estableciendo 5 grupos entre los 8 materiales estudiados, el grupo I conformado por el parental DANAC M255 a una distancia de 0,58; el Ciclo 2 perteneciente al grupo II con una distancia de 0,7; Diente de caballo, progenitor y ciclo 0 conformaron el grupo III a 0,78 de distancia, el grupo IV agrupando ciclo 1 y CENIAP DMR con 0,75 de distancia, por último el grupo se presentó a 0,55 de distancia conformado por el material INIA S7 (Figura 5).

**Cuadro 16.** Índice de similaridad y distancia de Dice para los 8 materiales utilizados en el estudio de polimorfismo.

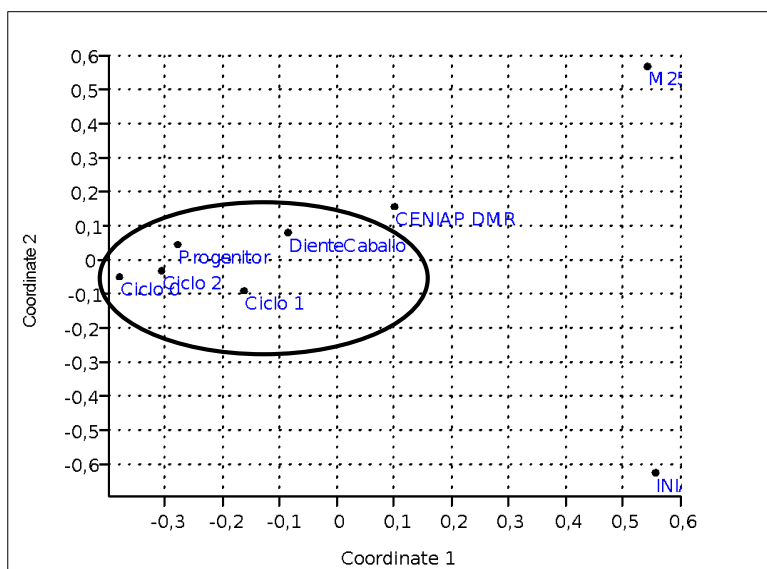
	Progenitor	Ciclo 0	Ciclo 1	Ciclo 2	Diente de Caballo	CENIAP DMR	INIA S7	M255
<b>Progenitor</b>	1,00							
<b>Ciclo 0</b>	0,78	1,00						
<b>Ciclo 1</b>	0,71	0,69	1,00					
<b>Ciclo 2</b>	0,72	0,70	0,66	1,00				
<b>Diente de Caballo</b>	0,81	0,75	0,74	0,67	1,00			
<b>CENIAP DMR</b>	0,68	0,59	0,75	0,65	0,75	1,00		
<b>INIA S7</b>	0,55	0,50	0,55	0,49	0,61	0,56	1,00	
<b>M255</b>	0,58	0,51	0,50	0,49	0,64	0,62	0,51	1,00



**Figura 5.** Dendrograma por medio del logaritmo UPGMA obtenido para 8 variedades de maíz, con 23 SSR polimórficos.

En el análisis de coordenadas principales (Figura 6) es posible observar las relaciones genéticas existentes entre los materiales evaluados del programa de mejoramiento UNET, donde Diente de caballo, progenitor, ciclo 0, ciclo 1 y ciclo 2 se encuentran agrupados mostrando una alta similitud genética influenciada evidente por el origen de estas variedades experimentales.

Perdomo (2012), hace referencia a la estrecha variabilidad genética que existe en los materiales que se liberan en los programas de mejoramiento en Venezuela, los cuales han sido marcados por la introducción de germoplasma proveniente del CYMMIT.



**Figura 6.** Relaciones genéticas entre los 8 materiales de maíz obtenidas a partir del análisis de coordenadas principales.

## 2. Variabilidad Genética Ciclo 1 y Ciclo 2

Para la determinación de variabilidad existente entre ciclo 1 al próximo ciclo de selección se observa en el Cuadro 17 con las frecuencias alélicas para cada alelo utilizando el microsatélites *phi011* ubicado en el cromosoma 1 que presentó polimorfismo entre ciclo 1 y ciclo 2. En el cuadro 17 se observa como el valor de PIC ha disminuido al avanzar un ciclo de selección, aumentando para el alelo A1 y disminuyendo para los A2 y A3. Ramis *et al.*, (2003) mencionan como en el proceso de selección es de esperarse que algunos alelos aparezca favorablemente a raíz de la disminución de otros, por lo cual de un ciclo a otro se observa como para el mismo locus algunas frecuencias alélicas aumentan y otras disminuyen.

La variación del PIC no es estadísticamente significativa, aun cuando varía. Este dato es importante para los programas de mejoramiento lo cual va a permitir respuestas favorables en el avance de la selección. El valor de PIC en el ciclo 1 fue de 0,5237 y en ciclo 2 de 0,4468.

**Cuadro 17.** Frecuencia alélica de cada alelo para el locus *phi011* entre los ciclos 1 y 2 de la población Diente de Caballo.

<b>SSR <i>phi 011</i></b>	<b>Alelo</b>	<b>pb</b>	<b>Ciclo 1</b>	<b>Ciclo 2</b>
			<b>f1</b>	<b>f2</b>
	A1	91	56,08	66,67
	A2	97	21,62	19,14
	A3	122	22,30	14,20
		<b>PIC</b>	<b>0,5237</b>	<b>0,4468</b>

En el cuadro 18 se presentan los resultados, donde el valor de los observados es menor que los heterocigotos esperados. Para el ciclo 1 la proporción de heterocigotos observados fue de 0,351 y para heterocigotos esperados fue de 0,593. En el ciclo 2 el valor de heterocigotos observado fue de 0,457 y la proporción de He de 0,502. Para ambos ciclos se mantiene la diferencia entre estas dos variables, corroborando que para este locus el valor de ocurrencia de heterocigotos fue bajo.

**Cuadro 18.** Heterocigosis observada (Ho) y esperada (He) para el SSR *phi011* en los ciclos 1 y 2 de la población Diente de Caballo.

SSR	<b>Ciclo 1</b>			<b>Ciclo 2</b>		
	n	Ho	He	n	Ho	He
phi011	74	0,351	0,593	81	0,457	0,502

## CONCLUSIONES

- Las variables morfológicas y agronómicas no presentaron diferencias significativas entre genotipos, por lo cual se hace necesario modificar a futuro los criterios de selección del programa de mejoramiento UNET.
- El avance genético para las variables morfológicas estudiadas entre ciclo 1 y ciclo 2 fue observado en proyección lineal en aumento para variables como altura de planta y altura de mazorca, por el contrario en floración masculina y floración femenina se obtuvieron plantas más precoces para ciclo 2.
- Los 45 SSR amplificados, fueron polimórficos 23 obteniendo un total de 73 alelos con un promedio de alelos por locus de 2,28. El PIC promedio fue de 0,48, se observó un alta similaridad genética entre los materiales Diente de caballo, progenitor, ciclo 0, ciclo 1 y ciclo 2, manteniendo afinidad genética con la variedad mejorada CENIAP DMR.
- Fue posible observar que estos 8 materiales presentaron una estrecha variabilidad genética, característica que se ha hecho común en los programas de mejoramiento genéticos en maíz implementados en Venezuela, productos del origen de los materiales utilizados en dichos programas.
- El valor de PIC disminuyó al avanzar desde ciclo 1 a ciclo 2 en la selección, aumentando para el alelo A1 y disminuyendo para los A2 y A3. Para ambos ciclos los valores de heterocigosidad observada fueron más bajos que los valores de heterocigosidad esperada. Estos datos corroboran que para el locus *phi011* el valor de ocurrencia de heterocigotos fue menor.
-

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Arnao, E. 2003. Selección Asistida por Marcadores Moleculares en un Programa de Retrocruzas en Arroz. Trabajo de Grado para obtener el Título de *Magister Scientiarum* en Agronomía del Postgrado en Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. 124p.

Barrios, M. y Bolotín, R. 2012. Análisis de la producción de maíz (*Zea mays* L.) en Venezuela entre 1999-2010. Revista Alcance, Edición Especial. pp. 41-55.

Benítez, L. 2002. Determinación del avance genético en primer ciclo de selección recurrente del maíz (*Zea mays* L.) cultivar Guayape en El Zamorano. Trabajo de Grado para optar al Título de Ingeniero Agrónomo. Escuela Agrícola Panamericana. Honduras. 27 pp.

Breseghello, F. and Sorrells, M. 2006. Association analysis as a strategy improvement of quantitative traits in plants. *Crop Science*. 46: 1323-1330.

Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 2015. Descubriendo la diversidad genética de la semilla. [En línea]: <http://www.cimmyt.org/es/donde-trabajamos/actividades-globales-del-cimmyt/descubriendo-la-diversidad-genetica-de-la-semilla>.

Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y del Trigo.1991. Descriptores para el Maíz. (CIMMYT/IBPGR). (Consulta 18 de Julio de 2015). [En línea]: [http://www.biodiversityinternational.org/uploads/tx\\_news/Descriptors\\_for\\_maize\\_Descriptores\\_para\\_maiz\\_Descripteurs\\_pour\\_le\\_ma%C3%AFs\\_104.pdf](http://www.biodiversityinternational.org/uploads/tx_news/Descriptors_for_maize_Descriptores_para_maiz_Descripteurs_pour_le_ma%C3%AFs_104.pdf).

Chawla, H. 2000. Introduction to plant biotechnology. Science Publishers. Enfield, USA.

365pp.

Confederación de Asociaciones de Productores Agropecuarios (FEDEAGRO). 2015. Estadísticas agropecuarias. Venezuela. [En línea]: <http://www.fedeagro.org/produccion/default.asp>.

Confederación de Asociaciones de Productores Agropecuarios (FEDEAGRO). 2015. Productividad del maíz. Venezuela. [En línea]: <http://www.fedeagro.org/detalle.asp?id=189>.

Coyac, J., Molina, J., García, J. y Serrano, J. 2013. La selección masal permite aumentar el rendimiento sin agotar la variabilidad genética aditiva en el maíz Zacatecas 58. Revista Fitotecnia. México. 36(1): 53-62.

Dellaporta, S., Word, T. and Hicks, T. 1983. A plant DNA mini preparation: Version II. Plant Molecular Biology Reporter. 1(14):19-21.

Di Renzo, JA; Casanoves, F; Balzarini, M; Gonzalez, L; Tablada, M; Robledo, C. 2011. INFOSTAT. Universidad de Córdoba.

Fassio, A., Carriquiry, A., Tojo, C. y Romero, R. 1998. Maíz: Aspectos sobre fenología. INIA. Uruguay. Vol. 101. 51pp.

Fuentes, M., Pantoja, A., Sotomayor, A. y Beaver, J. 1998. Selección recurrente recíproca en maíz: Tolerancia al ataque del gusano de la mazorca y el cogollero (Lepidoptera:Noctuidae). Agronomía Mesoamericana 9(1): 42-52.

García, P., San Vicente, F., Quijada, P. y Bejarano, A. 1999. Respuesta a la selección recurrente de familias de hermanos completos en poblaciones tropicales de maíz. *Agronomía Tropical* 49(1):19-40.

Gómez, V y Rodríguez, Z. 2001. Comportamiento agronómico de maíz (*Zea mays* L.) tipo dulce bajo diferentes densidades de siembra en condiciones de sabana. *Rev. UDO Agrícola* 1(1): 18-24.

Hallauer, A., Carena, M. and Miranda, J. 2010. Quantitative genetics in maize breeding. *Handbook of planta breeding*. Vol. 6. London. Editorial Springer Science. 663pp.

Hernández, A., San Vicente, F. y Figueroa-Ruiz, R. 2010. Evaluación y caracterización de líneas parentales de híbridos de maíz (*Zea mays* L.) en tres ambientes en Venezuela. *Interciencia*. 35(4): 290-298.

Liu, B. 1998. *Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis*. CRC Press. Nueva York, EEUU. pp. 62-63.

Martínez, A., Del Valle, R. y Briceño, W. 2006. Determinación del área, largo y diámetro de raíces en cinco clones del Banco de Germoplasma de *Musa*-UNET mediante el software SIARCS. *Resúmenes Congreso Nacional de Fruticultura*. pp. 7.

Maya, J. y Ramírez, J. 2002. Selección recurrente en tres poblaciones de maíz para al subtrópico de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* Vol. 25(2):201-207.

Mendoza, M., Oyervides, A., Latournerie, L. y De León, H. 2000. Selección recurrente en

maíz para el trópico húmedo. *Agronomía Mesoamericana*. 11(1): 89-93.

Montilla, J. 2002. Selección recurrente recíproca de familia de hermanos en dos poblaciones tropicales de maíz. Trabajo de Grado Maestría. 90pp (Consultado 17 de julio de 2015). [En línea]: <http://www.postgrado.ucv.ve/biblioteca/tesis.asp?id=TA760&fecha=3>.

Moreno-Pérez, E., Lewis-Beck, D., Cervantes-Santana, T. y Torres-Flores, J. 2004. Selección recíproca recurrente en poblaciones de maíz de valles altos en suelos con alto y bajo contenido de nitrógeno, en México. *Agrociencia* 38(1):305-311.

Muñoz, G., Giraldo, G. y De Soto, J. 1993. *Descriptores Varietales: Arroz, Frijol, Maíz, Sorgo*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 174 pp.

Muñozcano, M. 2011. Diversidad genética del maíz, perspectivas para su conservación y desarrollo en una comunidad Mixteca de Oaxaca: Santa María Tataltepec. Tesis para optar el Grado de Maestría. Colegio de Postgraduados. México. 64 pp.

Navarro, F., Youngquis, W. y Compton, W. 1992. Estimación de varianzas genéticas en maíz a partir de líneas S1 y S2. *Agronomía Mesoamericana* 3(1): 9-15.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2015. *Zea mays* overview. [En línea]: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid4577\[Organism:noexp\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid4577[Organism:noexp])

Nei, M. 1972. Genetics distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283-292.

Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2014. Perspectivas de cosecha y situación alimentaria (Consultado 15 de julio de 2015) [En línea]: <http://www.fao.org/docrep/019/i3618s/i3618s.pdf>

Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2015. Situación Alimentaria Mundial (Consultado 16 de julio de 2015) [En línea]: <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/>

Ortas, L. 2008. El cultivo de maíz: Fisiología y aspectos generales. Agrigan, Vol. 7. 4 pp.

Paliwal, R., Granados, G., Lafitte, H. y Violic, A. 2001. El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Departamento de Agricultura FAO. (Consultado 14 de julio de 2015) [En línea]: <http://www.fao.org/docrep/003/x7650s/x7650s00.htm#toc>.

Paterniani, E. 1967. Selección recurrente recíproca de maíz en familias de medios hermanos. Maracay. Volumen XIX Agronomía Tropical No 3. p 211-213.

Perdomo, R. 2012. Estimación de progreso genético en híbridos y variedades de maíz (*Zea mays* L.) blanco obtenidos por Fundación Danac en el periodo 1986-2006. Trabajo de Grado para obtener el Título de *Magister Scientiarum* en Agronomía del Postgrado en Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Pp. 96.

Pérez-Colmenares, A., Molina-Galán, J., Martínez-Garza, A., García-M, P. y Reyes-López, D. 2007. Selección masal para la adaptación a clima templado de razas tropicales y subtropicales de maíz de México. *Bioagro*. 19(3): 133-141

Pérez De La Vega, M. 2010. Marcadores moleculares, variabilidad genética y evolución. Universidad de León. III Simposio Científico en Biología Celular y Molecular. pp. 247-266.

Quiroz, A y Marín, D. 2003. Rendimiento en granos y eficiencia de una asociación maíz (*Zea mays*) y quinchoncho (*Cajanus cajan*) con o sin fertilizante. Bioagro 15(2).

Segovia, V. y Alfaro, Y. 1995. Evaluación de variedades experimentales de maíz en la región Nor-Oriental del Estado Guárico- Venezuela. Agronomía Tropical 46(2): 171-187.

Segovia, V. y Alfaro, Y. 2009. El maíz: Un rubro estratégico para la soberanía agroalimentaria de los venezolanos. Agronomía Tropical 59(3): 237-247.

Useche, N. 2006. Efectos de tres métodos de selección sobre el rendimiento de una variedad de maíz criollo en la Unidad Académica “La Tuquerena” Municipio Junín, estado Táchira. Trabajo de Grado Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Experimental del Táchira. San Cristóbal.