

Relaciones genealógicas y morfometría del pericarpio en maíces con calidad de proteína

Genealogical relationships and morphometry of the pericarp in quality protein maize

Germán Fernando Gutiérrez Hernández^{1*}, José Luis Arellano Vázquez², Karina Jiménez Durán³, Elpidio García Ramírez³, Estela Flores Gómez¹

RESUMEN

El maíz es esencial para la alimentación humana y animal en muchos países; particularmente, los maíces con calidad de proteína (MCP) pueden mejorar la dieta de personas con acceso escaso a proteína animal. El objetivo de este estudio fue generar la huella genómica de seis líneas de MCP y sus 15 cruces simples, analizar la morfometría del pericarpio de las semillas y relacionar ambos aspectos con su calidad de proteína. Las semillas fueron proporcionadas por el Campo Experimental Valle de México del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP, México). Se hizo la amplificación aleatoria anclada del ADN polimórfico (RAMPD) y el dendrograma se desplegó (NTSYS) con la distancia de Nei y Li. Para las mediciones del pericarpio se hicieron cortes transversales con microtomo en las semillas y se observaron al microscopio. Los experimentos se realizaron (2017) con tres repeticiones (25 semillas) en la Unidad de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional y en la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (Ciudad de México). Los datos del pericarpio se sometieron a análisis de correlación ($P \leq 0,05$) y se incluyeron los contenidos de triptófano, lisina, proteína e índice de calidad de proteína, obtenidos en experimentos previos. El dendrograma agrupó a los MCP altos a distancias menores al 14%. La cruce M3 x M6 tuvo el valor menor (5%). El pericarpio y las células alargadas se asociaron negativamente ($P \leq 0,05$) con las variables de calidad de proteína. El espesor del pericarpio se correlacionó directamente ($P \leq 0,05$) con el epicarpio, endocarpio, área del mesocarpio y las células alargadas, e inversamente con el mesocarpio. Las relaciones detectadas de los polimorfismos RAMPD y la morfometría del pericarpio con la calidad de proteína, podrían servir para hacer fitomejoramiento asistido de MCP.

Palabras clave: *Zea mays* L., maíces o2, pericarpio, RAMPD.

ABSTRACT

Maize is essential for human and animal nutrition in many countries; particularly, quality protein maize (QPM) can improve the diet of people with poor access to animal protein. The objective of the present study was to generate the genomic fingerprinting of six QPM lines and their fifteen simple crosses, analyze the pericarp morphometry of the seeds and relate both aspects to their protein quality. The seeds were provided by the Valle de México Experimental Station of the National Institute of Forestry, Agricultural and Livestock Research (INIFAP, Mexico). The anchored random amplification of the polymorphic DNA (RAMPD) was performed and the dendrogram was deployed (NTSYS) with the Nei and Li distance. For pericarp measurements, transversely sections were made with microtome in the seeds and observed under a microscope. The experiments were carried out (2017) with three replications (25 seeds) in the Biotechnology Unit, Instituto Politécnico Nacional and in the Faculty of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México (Mexico City). The pericarp data were subjected to correlation analysis ($P \leq 0,05$) and the tryptophan, lysine, protein and protein quality index contents obtained in previous experiments were included. The dendrogram grouped high QPM at distances less than 14%; in particular, the cross M3 x M6 had the lowest value (5%). Pericarp and elongated cells were negatively associated ($P \leq 0,05$) with protein quality variables. The thickness of the pericarp was directly correlated ($P \leq 0,05$) with the epicarp, endocarp, mesocarp area, and elongated cells, and inversely with the mesocarp. The detected relationships of RAMPD polymorphisms and the pericarp morphometry with the protein quality, would serve to make assisted improvement of QPM.

Keywords: *Zea mays* L., pericarp, QPM, RAMPD.

¹ Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Av. Acueducto s/n. La Laguna Ticomán. C.P. 07340. Ciudad de México, México.

² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Valle de México. C.P. 56250. Coatlinchán, estado de México, México.

³ Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Av. Universidad y Copilco. C.P. 04510. Ciudad de México, México.

* Autor para correspondencia: gfgutierrez@ipn.mx.

Introducción

El maíz (*Zea mays* L.) posee una plasticidad genética amplia y se cultiva en diversos ambientes y sistemas tecnológicos (Orozco-Ramírez *et al.*, 2017) satisfaciendo propósitos alimenticios, forrajeros, religiosos, medicinales. (Kato *et al.*, 2009). La Ley de Desarrollo Rural Sustentable (México, 2001) establece que el maíz es un producto básico y estratégico para la seguridad alimentaria mexicana.

En México se cultivan anualmente 7,4 millones de hectáreas de maíz y sólo en el 25% de ellas se emplea semilla mejorada (SIAP, 2016). En el 2018 se produjeron 27,2 millones de toneladas de maíz, con un rendimiento promedio de 3,3 toneladas de grano por hectárea (Virgen-Vargas *et al.*, 2016) y en los Valles Altos de México (estados de Tlaxcala, Puebla, Hidalgo, Querétaro, Michoacán, Morelos, Ciudad de México y Estado de México) se cosecharon 2 millones de hectáreas de grano de maíz con un rendimiento medio de 3,8 toneladas de grano por hectárea, que representaron el 28,5% de la superficie nacional cosechada (SIAP, 2020).

Las poblaciones rurales y marginadas tienen una ingesta escasa de proteína animal, por lo que el maíz con calidad de proteína se puede utilizar como fuente de proteína de calidad en la dieta de esos grupos sociales, ya que contiene el doble de lisina y triptófano que el maíz convencional, aminoácidos considerados esenciales porque no se sintetizan en especies monogástricas como los humanos y se deben incluir en la alimentación.

Los maíces con calidad de proteína adolecían originalmente de problemas como su endospermo suave, que reducía los rendimientos unitarios por su bajo peso, y su alta susceptibilidad a las plagas de almacén como gorgojos y palomillas (Gutiérrez *et al.*, 2014). Estos aspectos se han ido superando gradualmente mediante el trabajo genotécnico.

Existe un creciente interés a nivel mundial por desarrollar cultivares mejorados de maíz. Para conferir mayor eficiencia al proceso genotécnico es factible utilizar los marcadores moleculares asociados a las características bajo mejoramiento (rendimiento, proteína, tolerancia a sequía, entre otras). Son regiones localizadas en un mismo locus que difieren en su secuencia de bases nitrogenadas, como consecuencia de mutaciones o rearreglos cromosómicos, de manera que reflejan directamente

las variaciones a nivel del ADN entre los individuos de una población (Valadez y Kahl, 2000).

Los marcadores moleculares son dominantes o codominantes (Gutiérrez *et al.*, 2009), estables e independientes del ambiente de desarrollo del organismo analizado (Jiménez y Collada, 2000), es decir, corresponden directamente al ADN, no se modifican con la transcripción o la traducción de la información genética y, por tanto, son útiles para seleccionar individuos, para la identificación varietal y para estudios de similitud y de distancia genética (Bonamico *et al.*, 2004).

Existen diversos protocolos de marcadores moleculares (RAPD, RAMPD, SSR, RFLP y AFLP) (Ávila-Treviño *et al.*, 2017); sin embargo, algunos como los RFLP son procedimientos lentos y costosos a diferencia de los SSR, RAPD o RAMPD (Bonamico *et al.*, 2004), los cuales son muy sensibles para detectar polimorfismos (Vivek *et al.*, 2008).

La metodología RAPD (random amplified polymorphic DNA) consiste en utilizar iniciadores de 10 nucleótidos de longitud (pb) con una composición de guanina y citosina mayor al 50%, los cuales se alinean con el ADN genómico, se aparean las bases complementarias y, mediante variaciones cíclicas de temperatura, se sintetizan bandas de 200 a 2000 pb, a través de la actividad de una ADN polimerasa termoestable (Valadez *et al.*, 2005).

Los microsatélites también se utilizan como marcadores moleculares. Son nucleótidos cortos y repetidos, dispersos en el ADN nuclear de los eucariontes, cuya función podría ser regulatoria (Wu *et al.*, 1994).

Los fragmentos amplificados se despliegan según su peso molecular mediante electroforesis en agarosa o poliacrilamida. Algunos de ellos pueden ser genotípico-específicos y, por tanto, útiles para determinar la identidad varietal y para el fitomejoramiento asistido por marcadores moleculares (Vivek *et al.*, 2008).

Las bandas diferenciales entre genotipos (polimórficas) se originan por el cambio de un par de bases, por rupturas y fragmentaciones estructurales en el ADN, por deleciones que modifican o eliminan el sitio de inserción del iniciador, o bien, por translocaciones que separan los sitios de acoplamiento del iniciador a una distancia mayor a 2500 pb, a la cual ya no hay amplificación (Gutiérrez *et al.*, 2009).

En este trabajo se empleó la amplificación aleatoria del ADN polimórfico anclada con microsatélites (RAMPD) para obtener la huella genómica de maíces con calidad de proteína, técnica confiable y reproducible para determinar las relaciones genealógicas en maíz (Durán *et al.*, 2011).

El fruto del maíz es un cariósido seco e indehisciente con pericarpio delgado y soldado al tegumento seminal, razón por la cual erróneamente se le nombra semilla. El pericarpio es la estructura externa del fruto del maíz (sólo está recubierto por la cutícula), y es la barrera inicial para la invasión de patógenos o insectos, por lo cual su número de capas celulares y el grosor de estas influyen en la susceptibilidad a estos organismos (García *et al.*, 2003).

El pericarpio es de origen materno, mide de 60 a 140 μm de grosor y constituye el 5% del peso del grano. Anatómicamente está conformado por epicarpio, mesocarpio, células cruzadas y células tubulares; químicamente está constituido por fibras de celulosa (23%) y hemicelulosa (67%), inmersas en una matriz de sacarosa y con una pequeña fracción de lignina, la cual le confiere resistencia, firmeza y rigidez (Gutiérrez *et al.*, 2007).

El modelo de la pared celular del pericarpio de maíz propuesto por Saulnier y Thibault (1999) indica la presencia de heteroxilanos (arabinosa y xilosa, 50%), microfibrillas de celulosa (22%), compuestos fenólicos (5%), ácidos diferúlicos (2,5%) y trazas de lignina y proteínas. En este modelo, los heteroxilanos se unen por puentes diferúlicos constituyendo una red junto con las microfibrillas de celulosa. Las proteínas estructurales se unen, por puentes de isoditrosina, entre sí y con los ferulatos adheridos a heteroxilanos, generando una compleja red insoluble en agua. Este fenómeno forma una barrera mecánica que influye directamente en la robustez del pericarpio.

En maíces con calidad de proteína, además de la relación con la resistencia a insectos, el grosor y la dureza del pericarpio afectan el peso de grano y se relacionan con niveles altos de los aminoácidos esenciales lisina y triptófano.

El objetivo del estudio fue generar la huella genómica de seis líneas endogámicas de maíz con calidad de proteína y sus 15 cruzas simples, analizar la morfometría del pericarpio de las semillas y relacionar ambos aspectos con la calidad de proteína.

Materiales y métodos

Se emplearon semillas de 21 genotipos de maíz con calidad de proteína, proporcionadas por el Programa de Maíz del Campo Experimental Valle de México del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias: a) seis líneas endogámicas de maíz *opaco2*, con grano blanco y endospermo con textura normal (M1 a M6), derivadas de la cruce de las líneas CML 244 (S4), CML 352 (S5), CML 242 (S4), CML 246 (S3), CML 349 (S5) y CML 354 (S3), con la línea CML176 [(P63-12-2-1/P67-5-1-1)-1-2-B-B] del CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo), que fue la donadora del gen *opaco 2*; y b) las 15 cruzas simples directas formadas con las líneas anteriores (Tabla 1).

Los análisis se efectuaron durante el año 2017 en la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional y en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Huella genómica

Se extrajo el ADN de 0,1 g de embriones de las semillas de cada genotipo (Dellaporta, 1983)

Tabla 1. Maíces con calidad de proteína (líneas y cruzas simples) bajo estudio.

Tratamiento	Genotipo
1	M1
2	M2
3	M3
4	M4
5	M5
6	M6
7	M1 x M2
8	M1 x M3
9	M1 x M4
10	M1 x M5
11	M1 x M6
12	M2 x M3
13	M2 x M4
14	M2 x M5
15	M2 x M6
16	M3 x M4
17	M3 x M5
18	M3 x M6
19	M4 x M5
20	M4 x M6
21	M5 x M6

y se siguió la técnica de amplificación anclada del ADN polimórfico (RAMP) (Gutiérrez *et al.*, 2009; Durán *et al.*, 2011). Se emplearon diez iniciadores, de diez pares de bases de longitud, combinados con dos microsátelites (Tabla 2). La amplificación se llevó a cabo en 25 μ L utilizando el termociclador Mastercycler (Eppendorf Scientific, USA) y el programa de amplificación: a) un ciclo de 2 min a 94 °C (hot start) para activar la ADN polimerasa JumpStart (Sigma-Aldrich, USA); b) 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 48 °C, y 2 min a 72 °C; y c) 7 min a 72 °C, para la extensión final. La electroforesis se realizó en gel de agarosa (1,2%, p/v) disuelta en el amortiguador TBE (40 mM Tris HCl pH 8, 40 mM de borato, 2mM EDTA). Se empleó una cámara de electroforesis horizontal de 9 x 11 cm, se cargaron 100 ng del ADN; el gel se corrió 90 min a 80 mA y se tiñó (1 μ L/100 mL de solución de agarosa) con Rojo Texas (Bio-Rad Lab., USA).

Se codificaron los amplicones para cada iniciador (1 presencia y 2 ausencia de la banda). Con estos datos se construyó el dendrograma con el programa NTSYSpc (numerical taxonomy and multivariate analysis system, ver. 2.1) (Rohlf, 2000), con los parámetros: distancia de Seuil = 0, confiabilidad del 95% y el estimador de distancias de Nei y Li.

Mediciones del pericarpio

Las semillas de maíz se fijaron en formol, ácido acético, alcohol y agua (proporción: 1:0,5:5:3,5)

Tabla 2. Iniciadores empleados para la huella genómica de los maíces bajo estudio.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	T _m (°C)
RAPD		
1	CCCAAGGTCC	51,8
2	GGTGCGGAA	51,8
3	GAGTCTCAGG	48,4
4	TTATCGCCCC	48,4
5	TCAGGGAGGT	48,4
6	AAGACCTCC	48,4
7	ACGCACAACC	48,4
8	GCTGACTGTG	48,4
9	CTTACCCGA	48,4
10	CACCAGGCTA	48,4
Microsatélite		
1	(GACA) ₄	59,8
2	(GATA) ₄	51,3

T_m = Temperatura de alineamiento.

por 24 h a temperatura ambiente; se lavaron con agua destilada y se deshidrataron gradualmente en soluciones de etanol al 30, 50, 70, 85 y 96%, durante 2 h en cada una de ellas y con etanol absoluto al final. La infiltración de las semillas se realizó en una serie gradual de etanol y LR - White (3:1, 1:1 y 1:3) por 12 h a 4 °C. Finalmente, se sumergieron en LR - White puro por 24 h a 4 °C. La inclusión se llevó a cabo en cápsulas de gelatina a 56 °C por 24 h. Se hicieron cortes de 1 μ m de grosor por arriba del embrión con ultramicrotomo electrónico (Power Tome RMC, USA), los cuales se tiñeron con azul de toluidina (0 al 0,5%). Las observaciones y toma de fotomicrografías (100 y 400 X) se realizaron con microscopio compuesto (Olympus BX51, USA).

Para la morfometría del pericarpio se emplearon 3 repeticiones de 25 semillas de cada genotipo. Se midió (μ m) el grosor de las capas del pericarpio: epicarpio (Epi), mesocarpio (Mes) y endocarpio (End), así como el de las células alargadas (Ceal) y del área de las células del mesocarpio (Á). Estos resultados, junto con los contenidos de proteína (Pro), triptófano (Trp), lisina (Lis) e índice de calidad de proteína (Ical) obtenidos para cada genotipo en estudios previos (Arellano-Vázquez *et al.*, 2017) (datos no mostrados), se sometieron al análisis de correlación lineal de Pearson ($P \leq 0,05$). El análisis estadístico se hizo con el programa SAS.

Resultados y discusión

En estudios previos (Arellano-Vázquez *et al.*, 2017) se clasificó como maíces con calidad de proteína (MCP), por sus contenidos altos de Trp, Lis, Pro e Ical, a los progenitores M2 y M3 y a las cruzas M2 x M4, M2 x M6 y M3 x M6. También se catalogó como MCP con desempeño intermedio a las cruzas M2 x M5 y M5 x M6. Además se reportó que M3 x M6 y M5 x M6 no presentaron depresión endogámica para la calidad de proteína en su generación F₂, que es la que se consume como alimento. Estos resultados se relacionaron con el dendrograma generado con los datos de los marcadores moleculares y con la morfometría del pericarpio de estos maíces experimentales con calidad de proteína.

Huella genómica

Se obtuvo la matriz básica de datos con 187 filas (total de bandas amplificadas) y 21 columnas

(tratamientos). La distancia genética entre los 21 tratamientos fue del 18%, valor estrecho pero lógico porque la huella genómica codificada se derivó de un grupo de individuos genéticamente relacionados (Durán *et al.*, 2011).

Los primeros cinco iniciadores RAPD (10 pb) utilizados (Tabla 2) combinados con el microsatélite (GATA)₄, generaron una cantidad alta de bandas para las seis líneas progenitoras (M1 a M6); mientras que para las cruzas (M7 a M21), la mayor cantidad de bandas se presentó con los últimos cinco iniciadores RAPD mezclados con el microsatélite (GACA)₄.

En el dendrograma desplegado con los datos de la huella genómica (Figura 1), M2 y M3 tuvieron entre sí una distancia genética del 4%. Este dato evidenció que la huella genómica empleada los agrupó por su genealogía cercana, la cual coincidió con sus características sobresalientes de calidad de proteína.

Se apreció que la mayoría de los MCP destacados se alojaron a una distancia genética menor al 14%. En este sentido, las cruzas M5 x M6 y M2 x M5, de calidad proteica intermedia, se ubicaron a distancias de 9,5 y 14%, respectivamente. También M3 x M6, señalada por sus atributos superiores en calidad de proteína y por preservarlos en la F₂, se ubicó al inicio del eje de la distancia genética (0,05), junto a la cruz M1 x M3, así que M3 fue más importante para la calidad de proteína en estas combinaciones híbridas que por sí sola.

Entre las cruzas M2 x M4 y M3 x M6 se obtuvo una distancia genética del 8%, mientras que entre M2 x M4 y M4 x M6 la distancia fue del 4,5 y entre M3 x M6 y M4 x M6 fue del 3%.

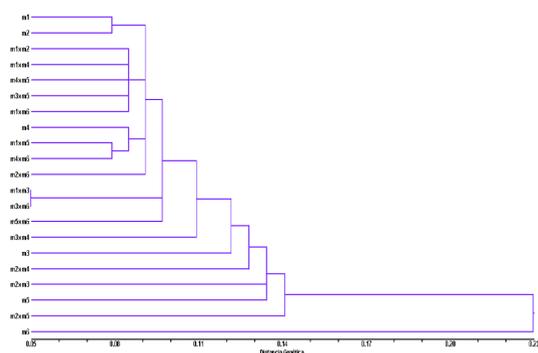


Figura 1. Dendrograma obtenido (RAMPD) de los maíces con calidad de proteína. Parámetros: distancia de Seuil = 0, confiabilidad del 95% y el estimador de distancias de Nei y Li.

Entonces, la distancia genética entre las cruzas disminuyó cuando tuvieron un progenitor común.

La cruz M2 x M6, de alta expresión de calidad proteica, tuvo una distancia genética del 1% con su progenitor femenino (M2) y del 14% con respecto al masculino (M6), así que estuvo más relacionada genéticamente con M2. Este genotipo de calidad proteica alta estuvo involucrado, también como hembra, en la mayoría de las cruzas MCP destacadas e intermedias.

Cabe mencionar que el protocolo de huella genómica utilizado en la investigación agrupó a los MCP según sus características genéticas y esto concordó con los atributos de calidad de proteína. Por tanto, sería factible incorporar esta metodología al mejoramiento genético de los MCP (selección asistida por marcadores moleculares). No obstante, debe considerarse que las distancias genéticas varían por factores biológicos (plasticidad fenotípica, mutaciones somáticas, estructura genética, grado de endogamia, entre otros) y metodológicos (cantidad y calidad del ADN aislado, parámetros del dendrograma) (Jiménez y Collada, 2000).

Morfometría del pericarpio

En las preparaciones permanentes de los cortes de pericarpio, se observó que esta estructura fue heterogénea en la forma, número, tamaño y ordenamiento de las células. No obstante, se detectó la tendencia a que genotipos con calidad de proteína alta (Figura 2 A) presentaran un pericarpio de dimensiones menores que los de calidad de proteína reducida (Figura 2 B). Esto se corroboró con los datos morfométricos del pericarpio que, aunados a los contenidos de Trp, Lis, Pro e Ical en las semillas bajo estudio, se sometieron a análisis de correlación (Tabla 3).

Hubo correlaciones altas y significativas entre las variables Trp, Lis, Pro e Ical, lo cual coincidió con otros estudios (Gutiérrez *et al.*, 2014) y se esperaba, puesto que son aspectos que configuran la calidad de proteína en los MCP. Lo relevante fue que el grosor del Per y el de las Ceal se asociaron negativamente ($P \leq 0,05$) con esas variables de calidad. Esto reviste interés porque sólo se había mencionado (Gutiérrez *et al.*, 2014; Gutiérrez *et al.*, 2017) al espesor del Per como negativo para la calidad proteica, de modo que las Ceal podrían servir también como indicadores de la calidad proteica.

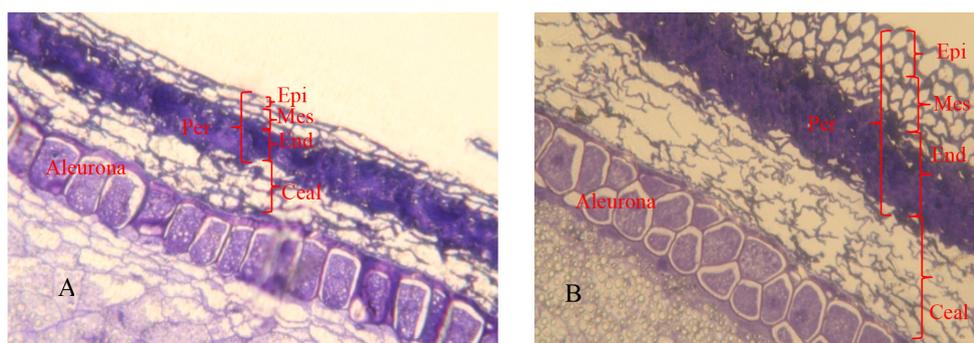


Figura 2. Corte transversal del pericarpio de los genotipos de maíz A: M2 x M4 de alta expresión de calidad de proteína y B: M1 x M5 de baja expresión de calidad de proteína. Per = Pericarpio, Epi = Epicarpio, Mes = Mesocarpio, End = Endocarpio, Ceal = Células alargadas.

Tabla 3. Coeficientes de correlación entre la calidad de proteína y la morfometría del pericarpio.

	Trp	Lis	Pro	Ical	Per	Epi	Mes	End	Ceal	Á
Trp	1	0,8**	0,6**	1**	-0,3**	0,1ns	-0,2ns	-0,2ns	-0,5**	-0,3*
Lis		1	0,6**	0,8**	-0,4**	0,1ns	-0,3**	-0,1ns	-0,4**	-0,4**
Pro			1	0,4**	-0,4**	-0,1ns	-0,2ns	-0,4**	-0,3**	-0,2ns
Ical				1	-0,3*	0,2ns	-0,2ns	0ns	-0,4**	-0,3**
Peri					1	0,5**	-0,8**	0,5**	0,7**	0,5**
Epi						1	-0,1ns	0,4**	0ns	-0,2ns
Mes							1	0ns	0,6**	0,5**
End								1	0ns	0,1ns
Ceal									1	0,7**
Á										1

Trp = Triptófano, Lis = Lisina, Pro = Proteína, Ical = Índice de calidad de proteína, Per = Pericarpio, Epi = Epicarpio, Mes = Mesocarpio, End = Endocarpio, Ceal = Células alargadas, Á = Área del mesocarpio. * = Significativo ($P \leq 0,05$), ** = ($P \leq 0,01$), ns = No significativo.

El grosor del Per se asoció ($P \leq 0,05$) positivamente con Ceal, Á, Epi y End, y negativamente con Mes, así que aumentó junto con sus elementos anatómicos Epi y End y los tejidos adyacentes Ceal y Á, y también conforme el Mes fue más estrecho.

Esto indicó que las dimensiones del pericarpio, en particular el grosor del Mes, estarían entre los criterios de selección de materiales genéticos básicos para desarrollar MCP. Es evidente que el escrutinio debe realizarse en poblaciones élite ya modificadas con la fuente del *opaco2*, en las cuales se hayan superado las características originales no deseables de estos maíces (grano

liviano, susceptible a plagas y con endospermo harinoso, etc.).

Conclusiones

El dendrograma construido agrupó a los maíces con calidad de proteína sobresalientes a distancias menores al 14%, y la cruz M3 x M6 tuvo el valor menor (5%). El pericarpio y las células alargadas se asociaron negativamente con la calidad de proteína. El espesor del pericarpio se correlacionó directamente con el epicarpio, endocarpio, área del mesocarpio y las células alargadas, e inversamente con el mesocarpio.

Literatura Citada

- Arellano-Vázquez, J.L.; Vázquez-Ramos, J.M.; García-Ramírez, E.; Mercedes Gómez-y-Gómez, Y.; Gutiérrez-Hernández, G.F. 2017. Monitoreo de la calidad proteica de maíz *o2* (*Zea mays* L.) en líneas endogámicas y su progenie F₁ y F₂. *Agrociencia*, 51 (4): 425-436.
- Ávila-Treviño, J.A.; Muñoz-Alemán, J.M.; Pérez-Molphe-Balch, E.; Rodríguez-Sahagún, A.; Morales-Domínguez, J.F. 2017. In vitro propagation from bud and apex explants of *Moringa oleifera* and evaluation of the genetic stability with RAMP marker. *South African Journal of Botany*, 108: 149-156.
- Bonamico, N.; Aiassa, J.; Ibáñez, M.; Di Renzo, M.; Díaz, D.; Salerno J. 2004. Caracterización y clasificación de híbridos simples de maíz con marcadores SSR. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 33 (2): 129-144.
- Dellaporta, S.L.; Word, J.; Hicks, J.B. 1983. A plant ADN minipreparation: Version II. DOF (Diario Oficial de la Federación). *Plant Molecular Biology Report*, 1: 19-21. México.
2001. Ley de Desarrollo Rural Sustentable. Diario Oficial de la Federación (DOF). México, D. F. México. 71 p.
- Durán H., D.; Gutiérrez H., G.F.; Arellano V., J.L.; García R., E.; Virgen V., J. 2011. Caracterización molecular y germinación de semillas de maíces criollos azules con envejecimiento acelerado. *Agronomía Mesoamericana*, 22 (1): 11-20.
- García L., S.; Andrew, J.B.; Serratos J., A.; Díaz P., D.; Arnason, D.M.; Bergvinson, D.J. 2003. Defensas naturales en el grano de maíz al ataque de *Sitophilus zeamais* (Motsch, Coleóptera, Curculionidae). *Revista de Educación Bioquímica*, 22 (3): 138-145.
- Gutiérrez, E.; Rojas-Molina, I.; Pons-Hernández, J.L.; Guzmán, H.; Agua-Ángel, B.J.; Arenas J.; Fernández, P.; Palacios-Fonseca, A.; Herrera, G.; Rodríguez M., E. 2007. Mecanismos y bases de la resistencia a insectos. *Cereal Chemical*, 84: 186-194.
- Gutiérrez H., G.F.; García R., E.; Arellano V., J.L.; Virgen V., J.; Ramírez S., G. 2009. Comparación molecular de la identidad genética de genotipos de maíz de diferente edad. *Agronomía Mesoamericana*, 20 (1): 1-9.
- Gutiérrez H., G.F.; Arellano V., J.L.; Vázquez R., J.M.; García R., E.; Vázquez L., P.; Flores G., E. 2014. Formación de híbridos de maíz con calidad proteica: lisina, triptófano e índice de calidad. *Revista de la Facultad de Agronomía Universidad del Zulia*, 31: 171-189.
- Jiménez, P.; Collada, C. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. Investigación Agrícola: Sistemas de Recursos Forestales. *Fuera de Serie*, 2: 237-248.
- Kato Y., T.Á.; Mapes S., C.; Mera O., L.M.; Serratos H., J.A.; Bye B., R.A. 2009. Diversificación y distribución reciente del maíz en México. Origen y diversificación del maíz. México, D.F. 116 p.
- Orozco-Ramírez, Q.; Perales, H.; Hijmans, R.J. 2017. Geographical distribution and diversity of maize (*Zea mays* L. subsp. mays) races in Mexico. *Genetic Resources of Crop Evolution*, 64: 855-865.
- Rohlf, F.J. 2000. NTSYSpc Numerical taxonomy and multivariate analysis system (ver. 2.1) Owner's Manual. New York Exeter.
- Saulnier, L.; Thibault, J.F. 1999. Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *Journal of Science and Food Agriculture*, 79: 396-402.
- SIAP (Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera). 2020. Producción anual de cultivos año agrícola 2014 en México. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>.
- Valadez M., E.; Kahl, G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas: Teoría y protocolos de laboratorio. Mundi-Prensa, México, D.F. 147 p.
- Valadez M., E.; Kahl, G.; Rubluo I., A.; Arreguín D., R. 2005. Optimización de las huellas de DNA obtenidas con RAPDS y MP-PCR mediante la técnica RAMPNR. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11: 351-356.
- Virgen-Vargas, J.; Zepeda-Bautista, R.; Ávila-Perches, M.Á.; Rojas-Martínez, I.; Espinosa-Calderón, A.; Gámez-Vázquez, A.J. 2016. Desespigamiento en cruza simples progenitoras de híbridos de maíz (*Zea mays* L.) para Valles Altos de México. *Agrociencia*, 50: 43-59.
- Vivek, B.S.; Krivanek, A.F.; Palacios-Rojas, N.; Twumasi-Afriyie, S.; Diallo, A.O. 2008. Breeding quality protein maize (QPM): Protocols for developing QPM cultivars. CIMMYT. El Batán, Texcoco, México. 50 p.
- Wu K., S.; Jones, R.; Danneberger, L.; Scolnik A., P. 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Research*, 22: 3257-3258.

