

23  
24



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores  
CUAUTITLAN



V N A M

**"COMPARACION DE LA CALIDAD FISICA, GENETICA  
Y FISIOLÓGICA ENTRE SEMILLAS DE HIBRIDOS  
Y VARIETADES DE MAIZ (*Zea mays* L.)  
CON DIFERENTE ORIGEN DE PRODUCCION"**

## T E S I S

Que para obtener el título de:  
INGENIERO AGRICOLA

P r e s e n t a :  
**Amadeo Meza Meza**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### A sesores:

- M. C. Alejandro Espinosa Calderón
- Dra. Susana Aspiroz Rivero
- M. C. Héctor Guillén Andrade



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

	PAG
RESUMEN.	i
INDICE DE CUADROS.	iii
INDICE DE FIGURAS.	iv
INDICE DE CUADROS DEL APENDICE.	iv
I INTRODUCCION	1
1.1 OBJETIVOS	4
1.2 HIPOTESIS	5
II REVISION DE LITERATURA	5
2.1 Antecedentes de la producción de semillas mejoras.	5
2.1.1 Organismos relacionados con la producción de semillas en México.	5
2.1.2 Marco legal de la producción de semillas mejoradas en México.	9
2.2 Marco conceptual.	11
2.2.1 Semilla.	11
2.2.2 Calidad de semilla.	13
2.3 Factores que afectan la calidad de las semillas.	18
2.3.1 Factores que afectan la calidad de la semilla en el campo.	18
2.3.2 Factores que afectan la calidad de la semilla en postcosecha.	19
2.4 Evaluación de la calidad de las semillas.	22
2.4.1 Calidad física.	23
2.4.2 Calidad sanitaria.	25

2.4.3	Calidad fisiológica.	26
2.4.4	Calidad genética.	33
III	MATERIALES Y METODOS.	39
3.1	Evaluación de la calidad física de las semillas.	39
3.1.1	Material genético.	39
3.1.2	Variables medidas.	41
3.2	Evaluación de la calidad fisiológica de las semillas mediante pruebas de vigor en invernadero.	42
3.2.1	Material genético.	42
3.2.2	Preparación del sustrato.	42
3.2.3	Selección y siembra de la semilla.	42
3.2.4	Variables analizadas	43
3.2.5	Diseño experimental.	47
3.2.6	Análisis estadístico.	47
3.3	Evaluación de la pureza varietal mediante el comportamiento fenológico en campo (grow-out) y las componentes del rendimiento.	48
3.3.1	Material genético.	48
3.3.2	Características del sitio experimental.	48
3.3.3	Manejo del cultivo.	49
3.3.4	Variables analizadas.	51
3.3.5	Diseño experimental.	56
3.3.6	Análisis estadístico.	57
3.4	Evaluación molecular de la pureza varietal.	57
3.4.1	Material genético.	57
3.4.2	Cosecha y tratamiento del tejido foliar.	58

3.4.3	Aislamiento y cuantificación del ADN genómico.	59
3.4.4	Digestiones de restricción del ADN genómico.	59
3.4.5	Transferencia del ADN genómico a membranas de nylon.	59
3.4.6	Amplificación y marcaje del inserto del plásmido.	60
3.4.7	Incorporación de Digoxigenin-d UTP dentro del inserto del plásmido.	61
3.4.8	Hibridación y detección de sondas marcadas.	62
3.4.9	Análisis estadísticos.	64
IV	RESULTADOS.	66
4.1	Calidad física de las semillas.	66
4.2	Calidad fisiológica de la semilla.	69
4.3	Evaluación de la pureza varietal en base al comportamiento fenológico y componentes del rendimiento.	72
4.4	Evaluación molecular de la pureza varietal mediante PLFR's.	75
4.4.1	Análisis de diversidad genética.	75
4.4.2	Análisis de pureza varietal.	78
V	DISCUSION.	82
5.1	Calidad de las semillas con diferente origen de producción.	82
5.2	Calidad de semilla en los orígenes pareados de cada genotipo.	90
VI	CONCLUSIONES.	103
VII	BIBLIOGRAFIA.	106
VIII	APENDICE.	112

## RESUMEN

Siete genotipos de maíz: V6-22, H-28, H-30, H-129, H-135, H-311 y HV-313; cada uno con dos orígenes de producción: INIFAP y PRONASE, fueron evaluados a través de caracteres fenotípicos de calidad mediante pruebas de vigor en invernadero así como del comportamiento fenológico y componentes del rendimiento en campo (grow-out). Adicionalmente, algunas características físicas en la muestra primaria de semillas fueron determinadas, en cada uno de los genotipos y para cada uno de los orígenes.

También se verificó un análisis de pureza varietal a nivel molecular mediante la técnica de marcadores genéticos moleculares basada en el Polimorfismo de las Longitudes en los Fragmentos de Restricción (PLFR's) del ADN genómico presente en cada uno de los materiales genéticos, siendo esto posible únicamente en tres híbridos de Valles Altos (H-28, H-30 y H-135) en virtud de que sólo para tales genotipos se obtuvieron sus líneas progenitoras.

Los experimentos de campo e invernadero, así como las determinaciones físicas de las muestras de semilla, se realizaron dentro de las instalaciones del CEVAMEX-INIFAP-SARH; en tanto que las determinaciones moleculares se verificaron en el CIMMYT, bajo la dirección del M.C. Hector Guillén Andrade

A las variables evaluadas en campo e invernadero, se les aplicó por separado pruebas de significancia estadística mediante la "t" de student para los orígenes de cada genotipo.

El análisis de la calidad genética entre algunos híbridos de Valles Altos, consideró dos partes: 1) La diversidad genética entre los diferentes materiales y 2) la pureza varietal presente en cada uno de los híbridos involucrados respecto a sus líneas progenitoras incrementadas por INIFAP. Los resultados mostraron que todos los híbridos involucrados en el análisis genético mostraron alelos "extraños" (alelos presentes en los híbridos pero no en las líneas progenitoras), siendo el más contaminado en todos los casos el origen PRONASE. Los datos de diversidad genética por análisis de PLFR's coincidieron con los cuadros de pedigree de los híbridos manejados.

En las comparaciones de los tratamientos pareados (orígenes diferentes de un mismo genotipo) hubo comportamientos diferenciales con significancia estadística a excepción del H-311. Así mismo se identificó inconsistencia entre cualidades físicas favorables de híbridos de origen PRONASE, y comportamiento de caracteres ligados a la calidad fisiológica en campo e invernadero.

## INDICE DE CUADROS.

CUADRO	TITULO	PAG
1	Factores que afectan la calidad de la semilla en el campo.	20
2	Características generales de los genotipos de maíz utilizados en el presente estudio.	40
3	Genealogía de los híbridos de maíz de origen INIFAP y PRONASE sometidos a análisis de PLFR's.	58
4	Relación de locus analizados y alelos detectados mediante PLFR's de tres híbridos de maíz de Valles Altos.	63
5	Características físicas de las muestras de semilla utilizadas en el presente estudio.	67
6	Medias de tratamientos y sus diferencias (%) para cada variable evaluada en invernadero y para cada par de orígenes por genotipo.	70
7	Medias de tratamientos y sus diferencias (%) para cada variable evaluada en campo y para cada par de orígenes por genotipo.	73
8	Matriz de distancias genéticas para tres híbridos de maíz de Valles Altos producidos por INIFAP y PRONASE (P).	76
9	Plantas (%) con alelos extraños en genotipos de maíz producidos por INIFAP y PRONASE.,	78



## INDICE DE FIGURAS

FIGURA	TITULO	PAG
1	Dendograma de distancias genéticas de tres híbridos de maíz producidos por INIFAP (I) y PRONASE (P).	76
2	Análisis de componentes principales a partir de la matriz de correlación de frecuencias alélicas de tres híbridos con diferente origen de producción.	77
3	Número de locus con diferencias alélicas, respecto a los alelos presentes en las líneas progenitoras de INIFAP.	80
4	Localización cromosómica de las diferencias detectadas por PLFR's en tres híbridos de maíz, - producidos por INIFAP y PRONASE.	81

## INDICE DE CUADROS DEL APENDICE.

CUADRO	TITULO	PAG
1A	Componentes de reacción para la digestión de restricción de ADN genómico.	112
2A	Componentes de reacción para la amplificación del inserto mediante tecnología PCR.	112
3A	Relación de componentes de reacción para la incorporación de Digoxigenin-dUTP-.	113
4a	Composición de buffers utilizados en la hibridación y marcaje de sondas.	113

## I INTRODUCCION.

Es sorprendente la transformación, que ha tenido el sector agropecuario a partir de la segunda mitad del presente siglo, propiciada por el uso de semillas mejoradas (PRONASE-INIA, 1982), mismas que resumen los avances en la genotecnia vegetal, cuyo objetivo es la alta productividad en las plantas (Milton, 1983).

No obstante lo anterior, algunas investigaciones recientes (INIFAP, 1989), señalan que en México la adopción de dicha tecnología semillera es de un escaso 14 %, lo cual es cuestionable, pues al menos en maíz, se han liberado hasta 1991 más de 150 variedades e híbridos comerciales (M. C. Alejandro Espinosa C., comunicación personal). Diversas razones tratan de explicar este bajo uso de semillas certificadas; sin embargo, es comprensible que mientras exista inseguridad por la calidad de la semilla que se distribuye, es poco lo que puede incrementarse en la utilización de éste insumo agrícola (Barkin y Suárez, 1983).

Así pues, la calidad de las semillas se manifiesta como un punto crucial en la aceptación de materiales mejorados. Esto obliga a establecer mecanismos e infraestructura adecuada, que permitan mantener las características agronómicas sobresalientes, a través de las diferentes actividades: primero, dentro del programa de mejoramiento genético, y luego, dentro del proceso de multiplicación, beneficio, almacenamiento, y distribución de la semilla.

Dentro de este último proceso en muchos casos se incorpora, a la certificación, cuyo objeto principal es el de garantizar el nivel de calidad física, genética, fisiológica y sanitaria de un lote determinado de semillas, que no obstante a ser producida en lugares distintos y años diferentes, ostentan la misma identidad de un híbrido o variedad mejorada. Tal certificación de calidad se lleva a cabo a través de inspecciones de campo y almacenaje; y le compete al Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). El cual a retomado algunos métodos proporcionados por la International Seed Testing Association (ISTA) para evaluar la calidad en las semillas.

Como lo manifiestan varios analistas de semillas, la calidad en las semillas es un concepto amplio (Bustamante, 1982) y en el cual sus componentes no pueden separarse al dictaminar su calidad total. Sin embargo al inferir sobre el estado de calidad de un lote de semillas mejoradas a partir de una muestra, es común delimitar los métodos que proporcionan finalmente inferencias por separado del estado general de excelencia de un lote de semillas. Dichos métodos resultan relativamente sencillos al evaluar la calidad física, fisiológica y sanitaria; pero no así para las determinaciones genéticas.

De esta manera, para cubrir tal requisito de calidad; el cual se refiere a la pureza varietal (comunmente asociada a la descripción varietal y control de calidad), tradicionalmente en muchos países miembros de la Unión Internacional Para la

Protección de las Nuevas variedades de Plantas (UPOV) se ha utilizado el grow-out (Arus, 1983). Dicho método es de gran utilidad, sin embargo contempla solamente parámetros que describen al fenotipo, y al respecto es necesario considerar que el potencial genético no es determinado únicamente por el genotipo, generando por ello una medida imperfecta del potencial genético en las plantas (Guillén, 1992).

En virtud de lo anterior la UPOV ha incursionado en la utilización de marcadores bioquímicos (patrones isoenzimáticos) como pruebas complementarias para determinar identidad y pureza varietales y lo cual le ha valido a Suecia para obtener derechos de patente (Bailey, 1983). Siguiendo esta misma línea, Guillén (1991) sugiere utilizar los marcadores genéticos en base al polimorfismo en segmentos de longitud restringida (PLFR's) como un requerimiento de la certificación, pues indica que esta técnica no es afectada por el ambiente por lo que las variedades serían siempre uniformes, independientemente del sitio en donde sean producidas.

En nuestro país el análisis de la calidad se ha centrado generalmente hacia la evaluación de la calidad física y fisiológica, en parte por la facilidad que implica su determinación. Aún cuando en sorgo se han realizado ocasionalmente trabajos de verificación genética en el norte de Tamaulipas (Rodríguez, 1988), es en maíz, y mediante el presente trabajo, donde se realiza una determinación genética para evaluar

la pureza varietal en tres híbridos de Valles Altos con origen diferencial.

Ante el Tratado de Libre Comercio y las modificaciones a la Ley y reglamentos de semillas, diversas empresas incursionan ahora en el mercado de semillas con los híbridos de INIFAP. Por lo cual resulta conveniente, a fin de tratar de ofrecer excelencia en calidad, definir claramente; y antes de la comercialización de la semilla, un mecanismo para la verificación genética. Propiciando con ello, que además de PRONASE varias empresas privadas y asociaciones de productores ofrezcan semilla de calidad de los mismos híbridos y variedades mejoradas.

Por todo lo antes mencionado, la inquietud del presente trabajo se basa en los siguientes :

#### 1.1 OBJETIVOS.

- 1) Definir el nivel de calidad genética en semillas certificadas de algunos híbridos de maíz con diferente origen de producción.
- 2) Determinar la pureza varietal, mediante la detección de semejanzas o diferencias en tres híbridos de Valles Altos con diferente origen de producción; utilizando marcadores genéticos moleculares (PLFR's) y marcadores morfofisiológicos (grow-out).

- 3) Determinar la calidad física y fisiológica en semillas certificadas de seis híbridos y una variedad mejorada de maíz, multiplicadas por dos diferentes instituciones: INIFAP y PRONASE.

Y para lo cual se plantean las siguientes:

## 1.2 HIPOTESIS.

1) Durante el proceso de multiplicación, beneficio, almacenamiento y comercialización de la semilla, es factible que ocurran desviaciones en la identidad genética y variaciones en la calidad física y fisiológica de la misma por efectos de manejo. Ello puede ser evidente en algún momento del desarrollo biológico.

2) Las pruebas de verificación genética en campo (grow-out) se pueden hacer más precisas y fáciles al incorporar la técnica de marcadores genéticos basada en el Polimorfismo de las Longitudes de los Fragmentos de Restricción (PLFR's).

## I I REVISION DE LITERATURA.

### 2.1 Antecedentes de la producción de semillas mejoradas.

#### 2.1.1 Organismos involucrados en la producción de semillas mejoradas en México.

Los albores de la producción de semillas mejoradas en México data del año de 1933 en que la Secretaría de Agricultura fundó un pequeño departamento de estaciones experimentales con jóvenes agrónomos mexicanos que recogían muestras de semillas de maíz y trigo del país buscando variedades de mejor rendimiento (Reyes, 1990).

Posteriormente, cuando en 1943 se crea la Oficina de Estudios Especiales, se fija el marco institucional para que en 1945 el gobierno mexicano y la fundación Rockefeller inicien un programa conjunto de investigación agrícola, que con el tiempo produciría la tecnología ahora asociada a la "Revolución Verde". A partir de ese momento se abrieron dos líneas de investigación: la OEE se preocupaba por obtener semilla híbrida, en tanto que los científicos de las estaciones experimentales (que para 1947 serían el Instituto de Investigaciones Agrícolas-IIA-) fijaban su objetivo en producir semilla de polinización libre (Barkin y Suárez, 1983).

Hacia enero de 1947, tomando en cuenta que es el maíz el alimento básico del mexicano se crea la Comisión Nacional del Maíz (y que más tarde sería la PRONASE), cuyos objetivos fueron aumentar los rendimientos mediante el mejoramiento genético y difusión de semillas mejoradas. Los resultados fueron buenos, pero la productividad se estancó y no aumentó significativamente durante 20 años (Reyes, 1990).

Por otro lado el sector privado figuraba en la producción de semillas hacia los años cincuenta de una manera individual y anárquica, siendo hasta 1968 cuando se constituye lo que hoy se reconoce como "Asociación Mexicana de Semilleros A. C." (AMSAC), que agrupa a los productores comerciantes y técnicos dedicados al ramo de la investigación, producción, beneficio y comercialización de semillas.

Respecto al sector oficial, en 1961 entra en vigor la ley sobre Producción, Certificación, y Comercio de Semillas (SARH-PRONASE, 1983), que crea al Sistema Nacional de Producción Certificación y Comercio de Semillas, el cual se integra de los organismos y servicios siguientes:

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA),  
actualmente INIFAP.

Comite Calificador de Variedades de Plantas (CCVP).

Registro Nacional de Variedades de Plantas (RNVP).

Productora Nacional de Semillas (PRONASE).

Asociaciones de Productores de Semillas (APS), y el

Servicio Nacional de Inspecciones y certificaciones de  
semillas (SNICS).



En resumen, las funciones de cada organismo dentro del proceso de producción de producción de semillas es el siguiente:

INIFAP.- La investigación oficial para el mejoramiento de las variedades de las plantas, el manejo del banco de germoplasma, su multiplicación y aprovechamiento en escala comercial.

CCVP .- Evaluar y calificar las variedades de plantas y ordenar su inscripción o cancelación en el RNVP, emitir opinión ante la Secretaria de Agricultura y Recursos Hidraulicos en todos los casos de importación o exportación de semillas.

RNVP.- Controla la inscripción y cancelación de variedades mediante expedientes y registra los resultados de las pruebas comparativas de campo de todas las variedades de plantas.

PRONASE.- Recibir del INIFAP las semillas originales resultantes de los trabajos de investigación para la producción de semillas basicas, registradas, y certificadas; establecer y operar campos de producción para producir, directamente o mediante la contratación de particulares las semillas certificadas que establezca en sus programas la Secretaria de Agricultura y Recursos Hidraulicos; comercializar las semillas registradas, Promover el establecimiento, organización, funcionamiento y vigilar la operación de las Asociaciones de Productores de Semillas, otorgarles asistencia técnica y

encomendarles preferentemente la producción, beneficio, distribución y venta de semillas certificadas.

APS.- Ser órganos de colaboración de la PRONASE en la ejecución de los programas de producción de semillas.

SNICS.- Llevar los registros de productores, siembras instalaciones industriales para beneficio y los actos de comercio interior y exterior de semillas; vigilar el cumplimiento de las especificaciones técnicas del proceso; expedir certificados de origen y calidad; controlar las etiquetas para certificación y calidad de las semillas que se importen al país y llevar el registro de todas las personas físicas o morales que se dediquen a tal actividad.

2.1.2 Marco legal de la producción de semillas mejoradas en México.

El 15 de julio de 1991, se publica en el Diario Oficial de la Federación la nueva Ley sobre Producción, certificación y Comercio de Semillas; que sustituye y complementa a la emitida en 1961. La reciente Ley considera cuatro capítulos que a continuación se resumen:

Capítulo 1o.- Esta ley regula : 1) Los trabajos de investigación para el mejoramiento de las variedades útiles al hombre 2) La producción y beneficio de semillas certificadas y verificadas 3)

La certificación y distribución de semillas y 4) La vigilancia de las normas técnicas. Así mismo son reconocidos cinco tipos de semilla: originales, básicas, registradas, certificadas y verificadas (aquellas provenientes de semillas básicas y registradas cuya verificación se realice por empresas sobre sus propias u otras que usufructen conforme a normas técnicas de certificación expedidas por la SARH).

Capítulo 2o.- La SARH es responsable de la investigación oficial de semillas, del banco de germoplasma (conteniendo semillas originales propias o de terceros). Las variedades de la SARH pueden enajenarse a cualquier persona para su multiplicación y comercialización. Las semillas certificadas o verificadas puestas en circulación deberán ostentar información referente a sus características específicas; además no se restringe la circulación de semillas aunque no sean certificadas o verificadas (excepto por cuarentenas). Respecto a la certificación y regulación de semilla la SARH es la encargada de: certificar el origen y la calidad de la semilla, expedir certificados con objeto de exportación, vigilar normas técnicas de certificación y verificación, fomentar el uso de las semillas certificadas y mejoradas, integrar inventario de equipo para beneficio y almacenamiento así como directorios de productores y comercializadores de semilla. Además la SARH tendrá a su cargo el RNVP donde serán consignadas las diversas características (agronómicas, fisiológicas, morfológicas y bioquímicas) de las variedades de plantas así como las áreas de adaptación

recomendadas. También se considera al CCVP integrado por SARH, organizaciones de productores, consumidores de semilla e instituciones de reconocida capacidad para tal efecto; el CCVP tendrá a su cargo: 1) evaluar las variedades para constatar la información ostentada en su comercialización, 2) emitir dictámenes técnicos solicitados por SARH y 3) actuar como arbitro en conflictos en materia de semillas.

Capítulo 3o.- Se refiere a infracciones, e indica que la SARH multará por mil o dos mil días de salario mínimo a quien comercialice, distribuya, importe o haga circular semilla que no corresponda "sustancialmente" con la información comercial dispuesta por la presente Ley. También multará por mil a diez mil días de salario mínimo a quien: expida certificados sin apearse a las normas establecidas en la presente Ley, ofrezca semilla certificada o verificada sin satisfacer tal reconocimiento.

Capítulo 4o.- Establece un recurso de reconsideración contra las resoluciones o sanciones que imponga la SARH y que perjudiquen a particulares.

## 2.2 Marco conceptual.

### 2.2.1 Semilla.

Existen diversas definiciones de lo que es la semilla, para Font Quer (1977), se trata de un embrión en estado de vida

latente o amortiguado, acompañado o no de tejido nutrico y protegido por el episperma. Hartman y Kester(1980), agregan que el embrión es una nueva planta que resulta de la unión, durante la fertilización, del gameto masculino con el femenino, cuya estructura básica consiste en un eje con puntos de crecimiento en cada extremo, uno para el tallo y otro para la raíz y una o más hojas seminales (cotiledones) fijadas en el eje embrionario. Asi mismo Hess (1980) indica que es un embrión estático rodeado de endosperma bien formado y que representa una unidad de diseminación. Por su parte, Pidi (1981) considera que las semillas son órganos que después de pasar un cierto tiempo inactivas al ubicarlas en condiciones oportunas de humedad, temperatura y aereación reproducen la vida de las plantas.

Por su parte, Moreno (1984) indica que dentro de términos agronómicos y comerciales se conoce como semilla a toda clase de granos, frutos y estructuras más o menos complejas que se emplean en las siembras agrícolas. Al respecto Garduño (1985) agrega que hay que diferenciar la semilla netamente biológica (la producida por la fecundación de un óvulo maduro) de la semilla agrícola a la que define como cualquier parte de la planta utilizada para reproducir un cultivo. Esta última definición concuerda con la que proporcionan Bustamante y Orozco (1986), los cuales identifican tres definiciones más, según sea el punto de vista:

Fisiológico.- Es una planta embriónica que consta de dos puntos de crecimiento que originan el sistema radicular por un lado y la parte aérea por el otro.

Botánico.- una semilla verdadera es un óvulo maduro fecundado, que posee una planta embriónica, material de reserva almacenado y una cubierta protectora.

Legal.- La semilla es una estructura importante, pues juega un papel vital no sólo en el ciclo de vida de las plantas sino también en la agricultura y comercio, forma parte esencial en el proceso de producción de los cultivos y es necesario que cumplan con ciertas características.

#### 2.2.2 Calidad de la semilla.

El concepto de la calidad en las semillas es ampliamente aceptado como la suma de múltiples atributos en ellas (Cadwel, 1962; Thompson, 1979; Bustamante, 1982; Santiago, 1988 y CIAT, 1991); y desde luego ésta definición se refiere a la utilidad que tengan para la siembra. Por ello la FAO (1978), nos refiere que las características principales que determinan la calidad de una semilla son: fidelidad con el cultivar, sanidad, pureza, contenido de semillas extrañas o de malas hierbas, poder germinativo, contenido de humedad, peso de mil granos, peso por volumen y daños mecánicos. Además, Carver (1980) señala como

factor de calidad al tamaño de la semilla, ya que considera que la semilla debe estar clasificada por un tamaño uniforme.

Debido a la diversidad de los elementos de la calidad, algunos de ellos arriba mencionados, y con objeto de evaluarlos, Bustamante y Orozco (1986) expresan a la calidad como una función dada por cuatro componentes, teniendo así la siguiente expresión:

$$\text{CALIDAD} = G + F + S + \text{CF}$$

donde :

G = Componente genético .

F = Componente fisiológico .

S = Componente sanitario .

CF = Componente físico .

Componente genético.

Este aspecto de la calidad se refiere a la identidad y pureza genética que guarda un determinado lote de semillas respecto a la semilla auténtica y original obtenida por el fitomejorador (FAO, 1978; García, 1981) y a la que se le atribuyen características agronómicas sobresalientes (Bustamante y Orozco, 1986). En suma, CIAT (1991) menciona que la calidad genética constituye el primer componente esencial de

la calidad total de la semilla. De esta manera la importancia de este componente se cifra en su capacidad de reproducir plantas con las mismas bondades genéticas a través del tiempo.

#### Componente fisiológico.

Esta parte de la calidad comprende a todos aquellos atributos que le proporcionan viabilidad a la semilla dentro de un rango razonable de condiciones tanto de almacenaje como de campo. Al respecto es necesario indicar que viabilidad significa el grado en que una semilla esta viva , metabólicamente activa y que posee las enzimas capaces de catalizar las reacciones necesarias para la germinación de la semilla y emergencia de la plántula (Bustamante y Orozco , 1986) .

Por lo anterior resulta conveniente aclarar otros dos conceptos intimamente relacionados con la calidad fisiológica: germinación y vigor.

AOSA, define la germinación como la emergencia y desarrollo de aquellas estructuras esenciales que de acuerdo a la semilla en estudio, son indicadores de su habilidad para producir una plántula normal bajo condiciones favorables (Sayers, 1982).

Por otro lado, según Perry (1980), en 1977 la International Seed Testing Association (ISTA) emite la siguiente definición de vigor: "vigor en las semillas es la suma de aquellas propiedades



que determinan el nivel de potencial de actividad y comportamiento de una semilla o lote de semillas durante la germinación y emergencia de la plántula". Por su parte, para 1978 AOSA da a conocer su definición: "el vigor en las semillas comprende aquellas propiedades de la semilla que determinan el potencial de una rápida y uniforme emergencia y el desarrollo de las plántulas normales bajo un amplio rango de condiciones en el campo".

#### Componente sanitario.

Este componente concierne al hecho de que la semilla se encuentre libre de microorganismos portados en ella. Hongos bacterias y virus, son los patógenos más comunes portados en las semillas de la mayoría de los cultivos. Dichos microorganismos se pueden encontrar en las simientes como contaminantes (mezclados) y asociados superficial o internamente (Bustamante y Orozco, 1986). Bustamante (1982), agrrega que este aspecto se refiere también a la condición sanitaria en relación a presencia de insectos de granos almacenados. Finalmente Cisneros (1986) resume que la sanidad en las semillas es la ausencia de patógenos o plágas trasmisibles por este medio.

#### Componente fisico.

Este aspecto involucra al conjunto de características que refieren el grado de contaminación física que presenta una

determinada partida de semillas. Muchos Organismos e investigadores (SAG, 1963; FAO, 1978; Bustamante, 1982; Moreno, 1984; Hernández, 1985) dentro de este componente coinciden en citar básicamente a tres elementos como indispensables para acreditar rasgos de calidad física a un determinado lote de semillas: a) pureza analítica, b) peso de la semilla y c) contenido de humedad. El primero de estos, es el que recubre la mayor importancia, ya que esta inspección por si misma nos informa ampliamente de las características físicas de una muestra representativa de semillas (Barrera , 1986).

El peso de las semillas, que comúnmente es asociado con características varietales (FAO, 1978), la cual es expresada como peso de mil semillas, suele ser en resumen un indicador indirecto de las condiciones de producción de dicha semilla en campo (FAO, 1978; Bustamante, 1982; Garay, 1983).

Respecto al contenido de humedad, la FAO (1978) menciona que es un factor importante ya que afecta directamente a la calidad de conservación, puesto que ello indicará si retiene su germinación desde su cosecha hasta su siembra (Bustamante, 1982) . Por otro lado, Tekrony (1980) agrega que la misma anatomía y morfología de la semilla afecta a su componente físico. Aunque existen algunos otros parámetros para atribuirle calidad física a un lote de semillas, como el color (García, 1981), el peso volumétrico, forma, etc., los tres primeros son los

mundialmente aplicados para efectos del análisis de la calidad física de una partida de semillas (Moreno, 1984).

### 2.3 Factores que afectan la calidad de las semillas.

Si se ubica a la semilla como una unidad biológica susceptible a ser dañada en todo instante (Moreno, 1976), se tendrá que ser razonable y admitir que dentro del proceso que involucra la producción de una semilla, desde su liberación por el fitogenetista, hasta la siembra por el agricultor, intervienen varios factores que determinan finalmente una sola calidad en la semilla. Dentro de éste amplio rango de factores, existen unos que no controla el hombre (Brauer, 1973), en cambio otros están ampliamente influidos por éste (Tijerina, 1980).

Hasta la fecha diversos estudios (Hunter, 1971; Austin, 1972; Bekendam, 1975; Bean, 1980; Carver, 1980; Hernández, 1985; Tekrony y Egli, 1991) han propuesto condiciones, manipulaciones y elementos que determinan en forma directa e indirecta la calidad en general de cualquier semilla.

Para facilitar el estudio de tales factores es conveniente dividirlos en dos grandes grupos: 1) Factores que afectan la calidad de la semilla en el campo, y 2) Factores que afectan a la calidad de la semilla en la postcosecha.

#### 2.3.1 Factores que afectan la calidad de la semilla en el campo.

Dentro de este conjunto de factores, Cisneros (1986) hace una amplia revisión de ellos, la cual se ha retomado para resumirlos en el Cuadro. 1.

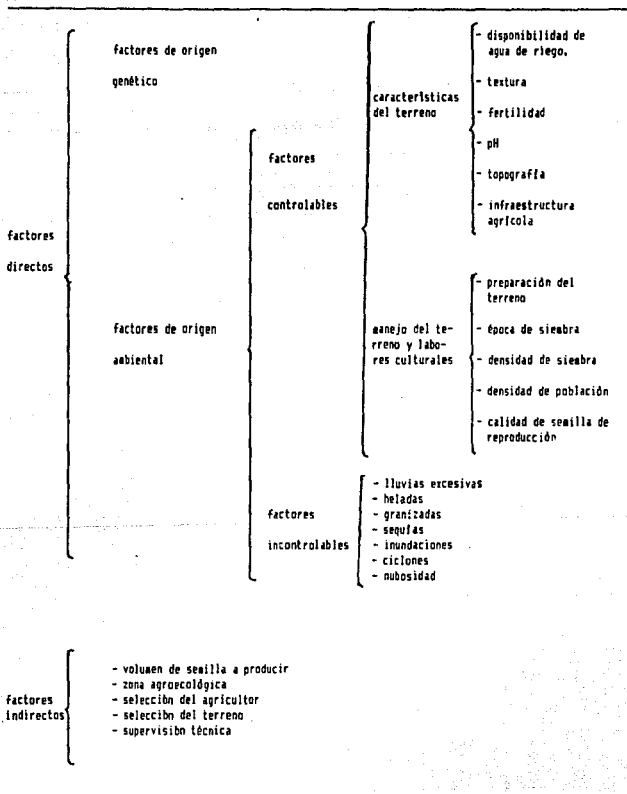
### 2.3.2 Factores que afectan a la calidad de la semilla en post-cosecha.

Dentro de este apartado se hace referencia al conjunto de condiciones y manejo que implican, ya no una mejora, sino exclusivamente un detrimento de la calidad de la semilla cosechada en el campo. Lo anterior se fundamenta en el hecho de que la semilla se encuentra en su máxima viabilidad y vigor en el momento que alcanza su madurez fisiológica (Hartman y Kester, 1980), de manera que los procesos que se realizan durante la cosecha, beneficio y almacenaje, no mejoran la calidad de la semilla, al contrario sólo provocan la disminución de la misma (Ramírez, 1991); ó en el mejor de los casos la conserva. De esta manera Poey (1991) hace evidentes a tres factores: beneficio, almacenamiento y comercialización.

#### Beneficio.

El beneficio de semillas es una parte integral de la tecnología de semillas implicada en la transformación del mecanismo genético seguido por el productor y genetista en el mejoramiento de la semilla. Por ello el beneficio de semillas abarca a todos los pasos comprendidos en la preparación de la

Cuadro. 1 Factores que afectan la calidad de la semilla en el caejo (Cisneros, 1986).



semilla cosechada para su venta (acarreo, desgranado, preacondicionamiento, secado, limpieza, clasificación, selección, tratamiento y envasado). Sin embargo en forma usual el beneficio representa el preacondicionamiento, limpieza, clasificación y selección de la semilla (Vaughan, 1970).

Es evidente que el beneficio de las semillas no aumenta la calidad de las mismas, sino que únicamente elimina a aquéllas que no reúnen los requisitos mínimos para su comercialización en términos de semilla de calidad (FAO, 1978). Resumiendo, el beneficio de semillas tiene como objetivo enaltecer la calidad que por sí misma porta la semilla y que debe ser:

- de alta pureza física.
- libre de semillas de malezas.
- de alta capacidad de germinación y vigor.
- de un tamaño uniforme.
- libre de enfermedades.
- con bajo contenido de humedad.

#### Almacenamiento.

Una vez seleccionadas y acondicionadas durante el beneficio, un factor muy importante que influye sobre la calidad de las semillas, son las condiciones del ambiente donde se almacenan (Becerril, 1987). En efecto, ya que los lotes de semilla están sujetos a pérdidas variables, adicionalmente a las naturales,

causadas principalmente por factores físicos, como la humedad relativa, la temperatura y la luz del ambiente (Hernández, 1985); y por factores bióticos como la presencia de plagas que influyen directamente sobre el vigor fisiológico de la semilla (Becerril, 1987).

#### Comercialización.

Quizá este es un factor poco ponderado en la función de calidad de la semilla, sin embargo la adulteración de las semillas ha sido por desgracia una práctica comercial muy común en Europa, Estados Unidos, México y muchos otros países (Alvarez, 1980). Así, es frecuente la mezcla de semillas más baratas e ilegítimas de la misma especie, así como de semillas de otras plantas e incluso hasta de arena tierra y otras impurezas (ibidem).

#### 2.4 Evaluación de la calidad de las semillas.

Teniendo en cuenta que el objetivo primario del análisis de semillas es proporcionar a los agricultores un dictámen sobre la calidad o valor agrícola de la semilla que compran, es necesario indicar que las metodologías utilizadas para evaluar los diferentes componentes de la calidad no resultan más importantes que las muestras mismas (Sayers, 1982). Al respecto un documento amplio para efectos de la determinación de la calidad física y fisiológica, es el que proporciona Moreno (1976). A continuación

se describen las técnicas comúnmente usadas para evaluar la calidad en un lote de semillas.

#### 2.4.1 Calidad física.

##### Pureza analítica.

Las reglas de la International Seed Testing Association (ISTA) establecen que el objetivo del análisis de pureza es determinar la composición en peso de los diferentes elementos de una muestra, ya sean semillas de otras especies o partículas de materia inerte (SAG, 1963). Esto se realiza con el examen de una muestra de trabajo, cuyo peso se determina según la semilla del cultivo. Posteriormente se identifican los componentes y se clasifican en:

- semilla pura .
- semilla de otros cultivos .
- semilla de malezas , y
- materia inerte .

El porcentaje de composición se determina mediante la siguiente expresión:

$$\% = \frac{\text{peso del componente (100)}}{\text{peso de la muestra}}$$



#### Peso de la semilla.

Este aspecto implica dos determinaciones: el peso volumétrico y el peso de mil semillas.

El peso volumétrico indica que tan liviana o pesada es una semilla, referida a un volumen ocupado, para realizar esta determinación se utilizan diferentes aparatos tipo balanza. El más común es el tipo Boerner donde se obtiene por lectura directa la expresión en kilogramos / hectolitro.

Respecto al peso de mil semillas, indica que semilla es más pesada respecto a otra; se determina tomando de la "semilla pura" repeticiones de cien semillas, pesándolas y calculando su peso a mil semillas. Es decir de la semilla pura se toma al azar ocho repeticiones de cien semillas cada una, enseguida es pesada cada repetición y se calcula la varianza, desviación estandar y coeficiente de variación. Si el coeficiente de variación no excede a 6.0 para semillas de zacate o 4.0 para otras semillas, el resultado es correcto.

#### Contenido de humedad.

Esta determinación tiene como objetivo conocer en peso el contenido de agua en la semilla (Bustamante, 1982), que esta íntimamente relacionada con: aspectos de calidad fisiológica, madurez de la semilla, capacidad de almacenamiento, longevidad en el almacenamiento, y daños diversos

Según Bustamante (1982) la determinación de humedad en las semillas puede hacerse con medidores electrónicos que permiten conocer el porcentaje de humedad con rapidéz, ya sea con lectura directa o apoyado con tablas previamente diseñadas. Para tal efecto se requiere un pesado exacto de la muestra (100 g.) y de la medición precisa de su temperatura, para su posterior corrección, por efectos de ésta. Algunos medidores comunes son diferentes modelos de Steinlite, Motomcò (equipos de constante eléctrica), Burrows, Universal (equipos de resistencia), etc.

Otro método (norma universal de ISTA) es el de la estúfa, en el cual la muestra de semilla se somete a temperaturas constantes (103 °C ó 130 °C) durante una o cuatro horas. Al final la pérdida de peso durante el secado se atribuye como el porcentaje de humedad.

#### 2.4.2 Calidad sanitaria.

El objetivo de estas pruebas es determinar el nivel de sanidad de una muestra de semillas con el fin de verificar si cumple las normas de calidad y protección hacia algún patógeno específico, o para detectar un patógeno en particular si hay problemas de emergencia, y en consecuencia para evaluar la necesidad de tratar la semilla con fungicidas. Las pruebas patológicas en America no se han desarrollado al nivel necesario y poco se realizan en los laboratorios de semilla.

### 2.4.3 Calidad fisiológica.

Los métodos que tradicionalmente se han diseñado para evaluar éste componente, fijan su objetivo en tres elementos a saber: viabilidad, germinación y vigor. De hecho al evaluar los anteriores elementos en un lote de semillas sera posible emitir un dictámen completo de la calidad fisiológica.

Para evaluar la viabilidad en las semillas se utiliza la prueba de tetrazolio (Moreno, 1984; CIAT, 1991). Esta prueba se basa en la evaluación de la actividad de las enzimas del grupo de las deshidrogenasas, responsables de los procesos de reducción en los tejidos vivos. Utiliza la sal cloruro de 2, 3, 5-trifenil tetrazolio en solución acuosa (solución incolora). Las semillas son colocadas enteras o cortadas al medio en imbibición. En las semillas vivas las deshidrogenasas se encuentran activas y reducen la sal de tetrazolio a un compuesto (formasana) de coloración rojiza, insoluble y estable. En las semillas muertas las enzimas estan inactivas y los tejidos permanecen incoloros. La distribución de áreas vivas y muertas en la semilla se puede estudiar interpretando el color de la semilla.

Respecto a las pruebas de germinación la semilla es colocada en condiciones controladas muy precisas consideradas como óptimas para la semilla que se esta evaluando durante determinados periodos de tiempo. Las Asociaciones de analistas de semillas

han dedicado mucho tiempo para identificar la temperatura, luminosidad humedad y métodos de laboratorio que puedan proporcionar la máxima germinación de la mayoría de todas las semillas. Así mismo se han establecido criterios para evaluar las plántulas al final de un período específico y así determinar si poseen las estructuras para producir plantas normales (SAG, 1963; Moreno, 1976; Moreno, 1984).

La prueba más comunmente utilizada en maíz es aquella sobre papel poroso enrollado. Esta consiste en tomar 100 semillas al azar y colocarlas uniformemente espaciadas entre papel poroso humedo. Las hojas de papel poroso son entonces enrolladas y se guardan a 25 ° C con 12 horas luz/día. El número de plántulas normales, anormales y semillas no germinadas son determinadas despues de 4 y 8 días de acuerdo con las reglas de la ISTA (SAG, 1963). Se clasifica como normal a la plántula que se encuentra dentro de las siguientes categorías: 1) plántulas intactas: plántulas con todas sus estructuras esenciales bien desarrolladas, completas en proporción y sanas, 2) plántulas con leves defectos en sus estructuras esenciales, que muestran una manera diferente de desarrollo balanceado y satisfactorio comparado con las plántulas intactas evaluadas de la misma prueba, y 3 ) plántulas con infección secundaria: plántulas comparadas con 1 y 2 arriba mencionadas, pero donde es evidente que la fuente de infección de hongo o bacteria es distinta a la semilla progenitora.

Finalmente las pruebas de vigor miden el potencial del comportamiento de un lote de semillas bajo diversas condiciones en campo, comparandolas con las condiciones óptimas usadas en una prueba estandar de germinación (Hall y Wiesner, 1990; Tekrony y Egli, 1991). En este sentido la ISTA (Sayers, 1982) ha creado varios criterios que deberían ser cumplidos, para poder aceptar efectivamente una prueba de vigor, éstos son:

- repetibilidad.
- correlación con el campo.
- rapidez.
- objetividad.
- facilidad y simplicidad, y
- economía.

En base a estos requerimientos se identifican cuatro tipos de pruebas:

#### 1) Pruebas de crecimiento

Se refieren a la evaluación de la germinación o tasa de crecimiento de la plántula y incluyen la clasificación del vigor de la plántula y la medición del crecimiento en la misma.

#### 2) Pruebas de estrés.

Aquí los factores de estrés que se espera que reduzcan la emergencia en el campo se manejan en el laboratorio bajo condiciones controladas, de esta manera se conduce:

La prueba de envejecimiento acelerado.- En la cual las semillas son anticipadamente envejecidas bajo condiciones de altas temperaturas y diferentes humedades, para después ser evaluadas en pruebas estandar de germinación.

La prueba de frio.- Se realiza en un suelo no esterilizado y diseñado de tal manera, que se simulen las condiciones frias y de alto porcentaje de humedad que se presentan generalmente al inicio de las siembras.

Germinación a baja temperatura.- Esta es una prueba estandar de germinación, que es conducida a temperaturas subóptimas y usada para algodón y otros cultivos de ciclo de verano.

### 3 ) Pruebas bioquímicas.

Este tipo de pruebas es de uso restringido, ya que requieren fuertes inversiones en equipo, así como también personal capacitado, dentro de estas se consignan a las siguientes:

Prueba de tetrazolio.- Esta prueba se basan en la actividad de las enzimas. Los índices de vigor se obtienen mediante la observación cercana de los patrones del tinte y la condición

física del embrión . Las pruebas que miden la actividad de las enzimas son usualmente las pruebas de vigor más rápidas .

Pruebas de la tasa de respiración.- La respiración del embrión es un índice de vigor . Para esto las semillas son germinadas midiendo la cantidad de bióxido de carbono producido . La mayor cantidad de CO<sub>2</sub> indica mayor vigor en la semilla (CIAT,1991).

Prueba de la actividad del ácido glutámico carboxilasa (GADA) .La enzima desdobra al ácido glutámico liberando bióxido de carbono . Una solución de ácido glutámico es añadido a las semillas finamente molidas y la cantidad de CO<sub>2</sub> que se produce de esta mezcla en 30 minutos de incubación es el índice de actividad de la enzima presente en la semilla, mediante el cual se estima el vigor (CIAT, 1991).

Prueba de nivel de Adenosin trifosfato (ATP) y carga energética.- La prueba se basa en la necesidad de abastecer la energía (ATP) necesaria en reacciones como la regulación de la biosíntesis de proteínas durante el proceso de germinación. La prueba consiste en poner a remojar la semilla durante un tiempo definido (4-6 hr.) y posteriormente medir el contenido de ATP; con lo que a mayor cantidad de ATP se obtendrá mayor vigor (CIAT, 1991).

#### 4) Otras pruebas.

Dentro de estas pruebas se subrayan algunas modalidades o combinaciones anteriores y en la cual se hace referencia a otras características medibles:

Prueba de velocidad de emergencia y/o germinación. para Tekrony y Egli (1991) el buen establecimiento de plántulas en el campo, depende de una uniforme y rápida germinación y por ende su respectiva emergencia (que es lo que realmente se observa). Lo anterior implica que después de que las semillas han empezado a germinar, deberán realizarse conteos diarios aproximadamente a la misma hora; la prueba termina cuando se considera que se ha logrado el máximo de germinación de las semillas sembradas. La expresión que nos permite calcular la velocidad de germinación y/o emergencia, es la siguiente:

$$V . E . = X_1 / 1 + X_2 / 2 + . . . + X_i / n$$

donde :

V.E. = Velocidad de emergencia

$X_i$  = número de semillas germinadas por día .

n = número de días después de la siembra .



Al final el lote que tenga el mayor valor de V.G. se considera como el más vigoroso.

Prueba de aguante (de Hilter - Brick Grit).- Esta es una prueba antigua (Sayers, 1982), en la cual las semillas son cubiertas por una capa de polvo de ladrillo esterilizado, el cual representa un obstáculo mecánico a la emergencia de las plántulas. Con ello la habilidad para atravesar dicha capa será una medida indirecta del vigor de las semillas.

Prueba de estrés osmótico.- Esta prueba se diseñó para hacer germinar a las semillas en diferentes condiciones extremas de humedad .

Pruebas de cambios en la permeabilidad.- Cuando la semilla se deteriora o se dañan las membranas celulares, ésta pierde diversas sustancias solubles en el agua porque sus membranas no tienen permeabilidad selectiva. La permeabilidad puede ser medida entonces remojando las semillas en agua destilada y luego midiendo la resistencia eléctrica del agua.

Prueba de conductividad eléctrica. Representa la medición directa de la conductividad eléctrica, cuando es colocado un lote de

semillas en agua destilada a 20 ° C deduciendo que a mayor conductividad eléctrica es más vigoroso como resultado de una mayor actividad metabólica.

#### 2.4.4 Calidad genética.

Antiguamente las pruebas de pureza varietal resultaban sencillas debido a que existían menos variedades y porque las diferencias entre ellas resultaban completamente evidentes (Bustamante, 1982). Sin embargo con el desarrollo del mejoramiento de las plantas, actualmente se hace imperioso tener nuevas y mejores técnicas para poder identificar a las diferentes nuevas variedades (Irastorza, 1991).

De esta manera los métodos para evaluar la pureza genética han cambiado radicalmente de simples observaciones visuales de semillas y plántulas a pruebas de campo y laboratorio: bioquímicas, citológicas y moleculares (USDA, 1988). Sin embargo habrá de reconocer que hasta la fecha muchas pruebas siguen siendo válidas debido a las características de cada cultivar, como resulta el caso de los grow-out (Arus, 1983), pues es casi imposible obtener variedades reproducidas sexualmente de absoluta uniformidad en todos los caracteres del fenotipo. Por otro lado y dentro de la práctica cabe afirmar que es preferible dar mayor

importancia a los caracteres económicos que a una uniformidad absoluta (Orozco, 1986). Lo anterior cobra sentido cuando asumimos que un fenotipo es la resultante del efecto genético, ambiental y de la interacción de ambos, pues la pureza genética no indica necesariamente homocigocis, sino que en realidad la semilla multiplicada reproduzca fielmente el fenotipo característico de cierta variedad (Brauer, 1973). Con base a lo indicado se destacan tres tipos de pruebas:

1) Métodos de laboratorio.

Aplicación de luz ultravioleta.- Se basa en la medición de respuesta de algunas especies que fluorescen bajo este tipo de luz (Bustamante, 1982).

Prueba de fenol y de otras sustancias químicas (peróxidos e hidróxidos de potasio).- Se basa en la respuesta de teñido en cuanto a la intensidad diferencial que presentan algunas semillas (Bustamante, 1982).

Marcadores genéticos.- estos, son diferencias fenotípicas controladas genéticamente. La utilidad práctica que han tenido, es la detección de eventos de recombinación (Stuber y Goodman, 1986; Melchinger et al, 1990; Lee et al, 1989; Godshalk et al, 1990), reconocimiento de genotipos (Arus, 1983; Bailey, 1983; Riedel et al, 1990; Smith y Smith, 1991 y Dudley et al, 1991) y

mapeo genético en muchas especies (Saghai-Marooft, et al, 1984; Smith et al, 1985; Frediani et al, 1987; Smith y Smith, 1988; Vaquero, 1990 y Melchinger et al, 1991).

Basados en la forma y el nivel en que los genes pueden ser detectados, los marcadores moleculares pueden ser divididos en dos clases: marcadores bioquímicos isoenzimáticos y marcadores basados en el polimorfismo de las secuencias de longitud restringida (PLFR's).

Para el primer caso, los marcadores isoenzimáticos, han dejado claro lo eficaz que resultan para diferenciar genotipos estrechamente relacionados (Tanksley y Orton, 1983). incluso para la obtención en derechos de patente (Bailey, 1983). Para estudiar las isoenzimas se utiliza la técnica de electroforesis (USDA, 1988), la cual discrimina por peso molecular y punto isoeléctrico (parámetros relacionados con la constitución de aminoácidos, que reflejan la diversidad genética asociada); enseguida la cantidad de enzima se revela por medio de reacciones específicas de tinción, dando bandas que forman un zimograma el cual constituye el "finger-print" o huella genética.

Respecto a los marcadores genéticos que utilizan el polimorfismo en las longitudes de los fragmentos de restricción (PLFR's)

pueden distinguirse dos grandes aplicaciones potenciales. La primera abarca a la determinación de relaciones genéticas, que incluye identificación varietal, protección de derechos de mejoradores y determinación de parentescos. La segunda área de aplicación es la identificación y mapeo de loci que afectan a rasgos cuantitativos, así como para rastrear dichos loci en programas de introgresión o selección de especies vegetales en el mejoramiento de plantas (Soller y Beckemann, 1983; Lee et al, 1989; Godshalk et al, 1990; Melchinger et al, 1990; Smith y Smith, 1991; Melchinger et al, 1991). Así mismo Guillen (1992), indica que esta innovación tecnológica representa la herramienta más sensible para detectar diferencias a nivel de ADN; y que inevitablemente será instrumental para establecer identidad de líneas, certificación de variedades, derechos de patentes, análisis de pedigree y pureza genética; ya que con pocas sondas (pruebas clonadas de ADN) se puede obtener la caracterización de diferentes genotipos.

Esta técnica consiste en el aislamiento del ADN de la planta (comunmente a partir de hojas); este, es cortado con una enzima de restricción y se fracciona de acuerdo a su tamaño mediante electroforésis en gel de agarosa. Luego los fragmentos de ADN se transfieren a una membrana de nylon donde se inmovilizan, una vez ahí, se hibridan a una sonda marcada con isotopos radioactivos o no radiactivos (biotina), que permite visualizarlos mediante una autorradiografía (Hoisington, 1992).

Este tipo de marcadores presentan seis propiedades que los hacen ser ideales como herramienta complementaria del fitomejorador y la tecnología de semillas: no deletéreos, ubicuos (permitiendo cubrir todo el genoma), alto nivel de polimorfismo, detección eficiente de variabilidad, codominancia y no son afectados por el ambiente (Kochert, 1990).

## 2) Métodos de invernadero o cámara de crecimiento .

Estos se basan en caracteres diferenciales de las especies o variedades y que pueden observarse en semilla o en estado de plántula; por lo tanto dichos métodos incluyen la observación visual de las semillas, basado en sus características propias; y la observación visual de las plántulas, en cuanto a rasgos distintivos durante su germinación y emergencia, como color del coleoptilo, pubescencia de la primer hoja, color del hipocotilo y otros.

## 3) Observación de ensayos en campo.

Este es un método que perdura y sigue siendo el más utilizado a nivel práctico, se refiere al sembrado de muestras representativas de un lote de semillas, en parcelas de campo y

observación de las características de las plantas , tanto morfológicas como fisiológicas, durante todo el ciclo vegetativo (CIAT, 1983). A este tipo de pruebas se les denomina grow-out (Arus, 1983).

### III MATERIALES Y METODOS.

El presente estudio se dividió en cuatro partes:

- 1a.- Evaluación de la calidad física de las semillas.
- 2a.- Evaluación de la calidad fisiológica de semillas, mediante pruebas de vigor en invernadero.
- 3a.- Evaluación de la pureza varietal mediante el comportamiento fenológico y las componentes de rendimiento en campo.
- 4a.- Evaluación molecular de la pureza varietal mediante (PLFR's)

Parte del estudio, se realizó dentro de las instalaciones del Campo Experimental del Valle de México (CEVAMEX-INIFAP-SARH). La 4a parte se verificó en las instalaciones del laboratorio de Genética Molecular en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT).

A continuación se precisan los materiales y métodos utilizados en cada una de las fracciones del presente estudio:

#### 3.1 Evaluación de la calidad física de las semillas.

##### 3.1.1 Material genético.

14 muestras primarias de un kilogramo de semillas, que representaron a cada uno de los materiales genéticos mostrados en



el Cuadro. 2, fueron proporcionados por la RED DE TECNOLOGIA DE SEMILLAS del CEVAMEX, a la cual se le depositaron después de un muestreo a las bodegas de los orígenes involucrados, y donde participaron técnicos de PRONASE, INIFAP y SNICS.

Cuadro. 2 Características generales de los genotipos de maíz utilizados en el presente estudio.

GENOTIPO	ORIGEN DE PRODUCCION	TIPO DE MATERIAL	AREA DE ADAPTACION (m.s.n.m.)
VS-22	INIFAP SANTA LUCIA 89	VARIEDAD SINTETICA	2200-2600
VS-22	PRONASE CUAPIAITLA 86	VARIEDAD SINTETICA	2200-2600
H-28	INIFAP CHAPINGO 88	HIBRIDO DOBLE	2200-2600
H-28	PRONASE TOLUCA 88	HIBRIDO DOBLE	2200-2600
H-30	INIFAP CHAPINGO 89	HIBRIDO DOBLE	2200-2600
H-30	PRONASE CUAPIAITLA 85	HIBRIDO DOBLE	2200-2600
H-129	INIFAP CHAPINGO 89	HIBRIDO DOBLE	2200-2350
H-129	PRONASE CUAPIAITLA 85	HIBRIDO DOBLE	2200-2350
H-135	INIFAP LA VIRGEN 89	HIBRIDO TRILINEAL	1700-2200
H-135	PRONASE CORTAZAR 89	HIBRIDO TRILINEAL	1700-2200
H-311	INIFAP NESTIPAC 88	HIBRIDO DOBLE	1200-1800
H-311	PRONASE PUEBLA 88	HIBRIDO DOBLE	1200-1800
HV-313	INIFAP NESTIPAC 89	HIBRIDO VARIETAL	1200-1800
HV-313	PRONASE ANECA 88	HIBRIDO VARIETAL	1200-1800

### 3.1.2 Variables medidas.

#### Pureza analítica.

Este análisis consistió en pesar 100 gr. de la muestra primaria de semillas, separando en semilla pura (aquellas semillas que mostraron sus estructuras completas y en buen estado) e impurezas, en ésta última, se incluyó a: fragmentos de estructuras de semillas, basura, tierra y en general cualquier material extraño, al final ambos separados se expresaron en porcentaje de composición.

#### Peso de mil semillas.

De la semilla pura, se contaron ocho repeticiones de 100 semillas cada una, se obtuvo el peso promedio, y se multiplicó por 10, dando así el peso de mil semillas en gramos.

#### Peso volumétrico.

Para ésta determinación, toda la muestra primaria se mezcló y separó a través de un separador Boerner, obteniendo dos muestras, enseguida parte de ambas muestras se pesó en una balanza volumétrica Boerner, donde se obtuvo por lectura directa el peso volumétrico en gramos por litro.

#### Tamaño de semilla.

Con ayuda de tres zarandas cuadradas (30 cm. por lado) con diámetros de orificio diferentes (0.6, 0.7, y 0.8 cm.), se obtuvieron tres tamaños: chico mediano y grande; esta separación fué sólo por diámetro de semilla y no por longitud. Al final cada tamaño se expresó en porcentaje de composición de la muestra.

### 3.2 Evaluación de la calidad fisiológica de las semillas, mediante pruebas de vigor en invernadero.

#### 3.2.1 Material genético.

Estuvo constituido por los 14 genotipos consignados en el Cuadro. 1

#### 3.2.2 Preparación del sustrato.

Para efecto de brindar mayor homogeneidad dentro del invernadero, con respecto al sustrato utilizado se realizó una mezcla que consistió de tierra, arena y materia orgánica con una proporción de 7:5:4 respectivamente. La mezcla se desinfectó con bromuro de metilo durante un tiempo de 48 horas; finalmente el sustrato fue distribuido en 4 bancales de 3 metros cuadrados y 0.6 metros cúbicos.

#### 3.2.3 selección y siembra de la semilla.

Se realizó una selección de la semilla a utilizar mediante zarandas, obteniendo un tamaño intermedio de 0.7 cm. de diámetro. Como la selección sólo fue a través de orificios redondos solo se separa por diámetro.

Se efectuaron cuatro siembras, cada una de ellas incluía 50 semillas por origen de cada híbrido o variedad, todas las semillas se introdujeron a una misma profundidad de 10 cm., teniendo una distancia entre hileras de 8 cm., y entre plantas de 5 cm.

Las siembras fueron escalonadas, la primera de ellas se efectuó el día 6 de mayo, la segunda el 8, la tercera el 10 y una última siembra el 13 de mayo; todas ellas durante 1991.

#### 3.2.4 Variables analizadas.

Velocidad de emergencia (VE).

Esta variable indica la rapidéz con la cual van apareciendo los coleóptilos de las plátulas de maíz sobre la superficie del sustrato; para tal efecto, se realizaron conteos diarios y a la misma hora desde el momento en que empiezan a emerger. Posteriormente, con los datos diarios del número de plantas emergidas se determinó la velocidad de emergencia aplicando la siguiente expresión:

$$V . E . = X_1 / 1 + X_2 / 2 . . . + X_{i-1} / n-1 + X_i / n$$

donde :

V.E. = Velocidad de emergencia .

$X_i$  = número de plántulas emergidas por día .

$n$  = número de días despues de la siembra .

La cosecha se realizó a los 25 días a partir de la siembra para cada una de ellas. Durante esta etapa las plántulas fueron extraídas con ayuda de cuchillas de lámima rectangulares (10 x 20 cm.) y procurando no dañar algún órgano de la plántula.

Porcentaje de germinación (GER).

El mismo día de la extracción de las plántulas, en cada tratamiento, se contaron aquellas que tenían radícula y plúmula bien desarrollada (aún las no emergidas), determinando con ello el porcentaje de germinación (Moreno, 1976), mediante la siguiente relación:

$$\text{Porcentaje de germinación} = \frac{\text{No. de plántulas normales (100)}}{\text{No de semillas sembradas .}}$$

A continuación en cada una de las repeticiones, las plántulas normales por tratamiento fueron seccionadas en tres partes: parte aérea, raíz y residuos de semillas. Cada conjunto

de estos elementos fué depositado en bolsas distintas de papel (con algunas perforaciones), de tal manera que al final se obtuvieron tres bolsas de papel por cada tratamiento, las cuales debidamente etiquetadas fueron colocadas al interior de una estufa, la cual se mantuvo a 75 ° C durante 24 horas. Posteriormente se determinaron los siguientes parametros:

Peso seco de la parte aérea (PSPA).

A los 26 días de la siembra, se determinó el peso séco de la parte aérea en gramos. Como el número de plántulas cosechadas fué variable, el PSPA se ajustó a 50 plántulas mediante la siguiente relación:

$$\text{PSPA} = \frac{\text{Peso obtenido de plántulas cosechadas (50)}}{\text{No. de plántulas cosechadas}}$$

Peso seco de raíz (PSR).

En ésta variable se siguió el mismo criterio de ajuste tomado para PSPA, a fin de inferir un peso de raíz en 50 plántulas. Esta determinación se hizo a los 26 días y con ayuda de una balanza granataria para expresar los diferentes pesos en gramos.

Peso séco de los restos de semilla (PSRS).

El peso del conjunto de restos de semilla por tratamiento, también fué ajustado, bajo el criterio usado en el PSPA, pero en este caso el peso final se obtuvo en miligramos.

#### Indice de eficiencia (IEF).

Este indice indica la utilización de nutrimentos portados en la semilla, y encaminados a una mayor cantidad de materia seca (expresada en los pesos de la parte aérea y de la raíz). Para generar esta variable se utilizaron otras, de la manera siguiente:

$$\text{IEF} = \frac{(\text{MS/PL}) (100)}{\text{PSC}}$$

donde :

IEF = Indice de eficiencia

MS/PL = Materia seca por planta

MS/PL = PSPA + PSR

PSPA = Peso seco de la parte aérea

PSR = Peso seco de raíz

PSC = Peso seco consumido

PSC = PIS - PSRS

PIS = Peso inicial de semilla

PSRS = Peso seco de restos de semilla

Materia seca por planta (MS / PL).

Esta variable es generada a partir de la suma del peso seco de la parte aérea y del peso seco de la raíz de las plántulas emergidas y dividida entre el número de ellas. Al final esta variable se expresa en miligramos.

#### Peso seco consumido (PSC).

Esta variable, la cual se expresa en miligramos, indica la cantidad de nutrimentos que fueron consumidos (inferida por la pérdida de peso) durante la germinación y emergencia. Se obtiene ajustado el peso de los restos de semilla y restandolo del peso inicial de las 50 semillas sembradas.

#### 3.2.5 Diseño experimental.

El diseño experimental utilizado fué el de tratamientos pareados (Steel y Torrie, 1990), con cuatro repeticiones. Cada par de tratamientos estuvo integrado por dos orígenes de producción (INIFAP y PRONASE) de un mismo genotipo.

#### 3.2.6 Análisis estadístico.

A cada uno de los pares de tratamientos y para cada variable involucrada, se le aplicó el criterio de la prueba "t" de student.



### 3.3 Evaluación de la pureza varietal mediante el comportamiento fenológico y las componentes de rendimiento en campo (grow-out).

#### 3.3.1 Material genético.

El material genético, al igual que para las pruebas de invernadero, estuvo integrado por dos grupos bien definidos de los siguientes genotipos: VS-22, H-28, H-30, H-129, H-135, H-311 y HV-313 el primer grupo correspondió al origen INIFAP y el segundo al origen PRONASE. En el Cuadro. 2 se puede apreciar que los materiales antes mencionados difieren tanto en año como en lugar de producción (origen diferencial), así mismo se incluyen genotipos para riego y temporal.

#### 3.3.2 Características del sitio experimental.

##### Ubicación.

Este experimento de campo se estableció en las instalaciones del Campo Experimental del Valle de México (CEVAMEX), el cual se ubica aproximadamente a los 19° 29' de latitud norte y a los 98° 33' de longitud oeste, y a una altitud de 2240 msnm.

##### Clima.

Según el sistema climático de Koppen modificado por García (1973), el área de influencia del CEVAMEX adopta el clima correspondiente al: C (Wo) (W) b (i') g. Cuya descripción corresponde a templado subhúmedo con régimen de lluvias en verano, con oscilación térmica entre 5 y 7 °C, con presencia del mes más caliente antes del solsticio de verano; y con una precipitación media anual de 680 mm.

#### Características edáficas.

El suelo presenta textura arcillo-limosa; con pH de 6.8; el contenido de materia orgánica es regular; con mediano contenido de nitrógeno; es rico en fósforo asimilable y su contenido de potasio, calcio y magnesio intercambiables es rico; no presenta problemas de sales solubles ni de carbonatos alcalinotérreos (Cervantes, 1990).

#### 2.3.3 Manejo del cultivo.

##### Siembras.

La siembra se efectuó el día 18 de abril de 1990 dentro del ciclo primavera-verano, bajo el sistema de "pala", depositando 4 semillas por sitio de siembra y a una distancia entre matas de 50 cm, posteriormente se hizo un aclareo para dejar sólo tres plantas por mata.

#### Fertilización.

Se efectuó una fertilización al momento de la siembra bajo la dosis 50-50-50, y otra en la segunda escarda a los 45 días de siembra con la dosis 100-00-00.

#### Escarda.

Se realizaron dos escardas con tractor, la primera fué a los 15 días de sembrado y la segunda a los 45 días.

#### Riegos.

Se practicó sólo un riego de auxilio, siendo éste dos días antes de la siembra.

#### Control de malezas.

El control de malezas se realizó tanto químico como manual. Dentro del primero, se aplicó el herbicida Primagram a razón de 2 lt/ha. al siguiente día de la siembra, también a los 8 días de siembra se asperjó una solución de Hierbamina + Gesaprin-50 con una dosis de 1lt/1kg/ha respectivamente. De manera adicional se practicaron dos deshierbes manuales uno a los 45 días y otro a los 60 días de sembrado.

#### Control de plagas.

Se aplicó el insecticida de contacto-sistémico Nuvacrón-60 a los 40 días de sembrado para el control del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* (J.L. Smith)).

#### Cosecha.

La cosecha se realizó a los 221 días de la siembra, cosechando los dos surcos centrales de cada unidad experimental y cosechándose manualmente.

#### 3.3.4 Variables analizadas.

##### Rendimiento de grano (REN).

El rendimiento de grano se estimó considerando una humedad comercial del 14 %, y utilizando la ecuación propuesta por el CEVAMEX para tal fin:

$$\text{REN} = \frac{[(\text{P.C.}) (\% \text{ MS}) (\% \text{ GR}) (\text{F.C.})]}{8600}$$

donde :

REN = Rendimiento de grano con 14 % de humedad

P.C. = Peso húmedo o de campo

% MS = Porcentaje de materia seca

% GR = Porcentaje de grano por mazorca

F.C. = Factor de corrección para obtener rendimiento por

ha.; éste se obtiene dividiendo 10000 entre la superficie de la parcela útil.

#### Area foliar (AF0).

Esta variable se determinó en la lámina foliar correspondiente al nudo inmediatamente por arriba de la mazorca superior y conforme a la ecuación propuesta por CIAT (1983) :

$$AF0 = L \times A (0.75)$$

donde :

AF0 = Area foliar

L = Longitud de la lámina foliar

A = Ancho de la lamina foliar

#### Acame (ACA).

Su determinación, consistió en contar el número de plantas acamadas (aquellas que se presentaron completamente caídas) al momento de la cosecha y deduciendo su proporción en porcentaje respecto al número total de plántulas de la parcela útil.

#### Altura de planta (ALP).

Se midió la distancia en centímetros desde la superficie del suelo hasta el punto de inserción de la espiga sobre el tallo de la planta de maíz.

Altura de mazorca (ALM).

Se midió la distancia en centímetros del punto de inserción de las raíces hasta el nudo donde se produce la yema axilar que da lugar a la mazorca superior.

No. de hojas (NHO).

Se contó el número de hojas total presentes en el tallo desde la base de la planta hasta el punto de inserción de la espiga.

Días a floración masculina (FMAS).

Fué el número de días transcurridos desde la siembra hasta alcanzar el 50 % de floración masculina y a la cual se le consideró como su estado de antesis.

Días a floración femenina (FFEM).

Fué el número de días transcurridos desde la siembra hasta alcanzar el 50 % de floración femenina, identificándose por la presencia de estigmas fértiles.

Longitud del eje central de la panoja (LEC).

Se determinó en centímetros, midiendo la longitud total del eje central de la espiga (panoja) desde la inserción de la planta hasta el extremo apical del eje.

Número de ramas secundarias en la panoja (RAS).

Se contó el total de ramas secundarias en cinco plantas tomadas al azar, sacando con ello un promedio por tratamiento en cada repetición.

Cantidad de mazorcas podridas (MPO).

Esta variable se determinó al momento de la cosecha, contabilizando el número total de mazorcas podridas por parcela útil y deduciendo su proporción en porcentaje respecto al número total de mazorcas cosechadas.

Longitud de mazorca (LMA).

Posterior a la cosecha, se eligieron al azar cinco mazorcas, a las cuales se les determinó su longitud en centímetros con ayuda de forcipulas rústicas.

Diámetro de mazorca (DIM).

A las mazorcas muestreadas se les determinó su diámetro central en centímetros, auxiliándose para ello de un vernier.

Hileras por mazorca (HPM).

Se obtuvo de la misma muestra de cinco mazorcas contando las hileras de cada mazorca para generar un promedio de ellas.

Número de granos por hilera (GPH).

Se determinó contando los granos de cinco hileras por cada una de las mazorcas muestreadas y deduciendo un promedio para cada tratamiento en cada repetición.

Porcentaje de materia seca (% MS).

Se desgranó una muestra de cinco mazorcas y se determinó el porcentaje de humedad (pesando 100 gr. del grano mezclado) con un determinador eléctrico "Stenlite"; en base al porcentaje de humedad y con ayuda de tablas ya preparadas para este efecto se determinó la cantidad de materia seca en porcentaje mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de Materia Seca} = 100 - \% \text{ de Humedad}$$

Cantidad de grano por mazorca (CGR).

Esta variable se determinó a partir de cinco mazorcas, las cuales se pesaron, se desgranaron y al final se peso por separado al conjunto de olores y al total de grano obtenido; después se



obtuvo en porcentaje la proporción que ocupó el grano respecto de la mazorca.

Peso de 200 granos (P200).

En cada uno de los tratamientos se tomó una muestra de las cinco mazorcas desgranadas, se contaron 200 granos y se pesaron con ayuda de una balanza granataria, el peso se obtuvo en gramos.

Peso volumétrico (PEVO).

El grano obtenido al desgranar las cinco mazorcas fué mezclado en un mezclador Boerner, luego se obtuvo un volumen de un litro de grano con ayuda de una balanza Boerner y al final dicho volumen fué pesado en una "bascula de reloj" Pigure.

Diámetro de olote (DIO).

De los olotes obtenidos al desgranar las cinco mazorcas se midió en centímetros su diámetro central, procediendo a deducir un promedio para cada tratamiento en cada repetición.

### 3.3.5 Diseño experimental.

El diseño experimental utilizado fué el de tratamientos pareados con cuatro repeticiones. Los tratamientos pareados fueron formados por dos orígenes de producción (INIFAP y PRONASE) de un mismo genotipo.

Parcela experimental.

Estuvo integrada por 56 unidades experimentales de 17 metros cuadrados cada una, generando una superficie de 952 m<sup>2</sup>.

### 3.3.6. Análisis estadístico.

A cada uno de los tratamientos pareados y para cada variable involucrada, se le aplicó el criterio de la prueba "t" de student

## 3.4 Evaluación molecular de la pureza varietal.

### 3.4.1 Material genético.

Esta parte del estudio, únicamente incluyó a los híbridos de maíz H-28, H-30, H-135, en virtud de que sólo se contaron con los progenitores de estos genotipos.

Para cada uno de los híbridos, se incluyeron dos orígenes: INIFAP y PRONASE, así como el conjunto de líneas progenitoras de tales genotipos (estas últimas sólo incluyeron a las incrementadas por el Programa de la Red de Tecnología de Semillas del CEVAMEX). En el Cuadro. 3 se indica la genealogía de los híbridos utilizados en esta determinación molecular de la pureza varietal.

Cuadro. 3 Genealogía de los híbridos de maíz de origen INIFAP y PRONASE sometidos a análisis de PLFR's .

HÍBRIDO	GENEALOGIA	LÍNEAS
H-28	[(M17 x M18) x (M15 x M16)]	M15 = Mich 21-26 M16 = Mex39 Compl x [(Mich21-20)1]-29-2 M17 = Mich21 Compl-27-2 M18 = Mich 21 Compl-1-7-2
H-30	[(M27 x M28) x (M29 x M30)]	M27 = Mich21 Compl-183 M28 = Mich21-181-14-1 M29 = Mich21-88-3-3 M30 = CR-439
H-135	[(B32 x B33) x (M35)]	B32 = H353-245-6-10 B33 = H353-363-7-2 M35 = H60-10-3

1 Este orden de combinación es inverso, y PRONASE multiplica el H-28 en orden directo, es decir: (M-15 x M-16) x (M-17 x M-18).

### 3.4.2 Colecta y acondicionamiento del material vegetativo.

Se eligieron ocho plantas al azar del cultivo en pie de los híbridos H-28 y H-30, siendo para el 135, sólo cinco plantas, en todos los casos se incluyeron los dos orígenes involucrados; además, de las líneas progenitoras se muestrearon cinco individuos. De cada planta se cortaron dos hojas juveniles, intermedias y completamente sanas, a las cuales se les eliminó la nervadura central. Así las hojas muestra fueron manejadas en bolsas de malla de fibra de vidrio y congeladas a una temperatura de -176 ° C mediante la aplicación de nitrógeno líquido,

posteriormente se liofilizaron durante 72 hrs., luego se molieron y finalmente se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.4.3 Aislamiento y Cuantificación del ADN Genómico.

La extracción del ADN genómico de cada muestra se realizó utilizando de 300 a 400 mg de tejido molido, aplicando el método de Saghai-Maroof et al, (1984), la extracción se hizo con etanol. La cuantificación del ADN se llevó a cabo mediante un espectrofotómetro de luz ultravioleta, determinando de esta manera la cantidad y calidad del ADN.

#### 3.4.4 Digestiones de restricción del ADN genómico.

De cada una de las muestras se digirieron 10  $\mu\text{g}$  de ADN, se preparó una mezcla de reacción sobre hielo con todos los componentes indicados en el Cuadro 1A, para esta mezcla, la enzima se agregó al último. Se prepararon tubos con una alícuota de 300  $\mu\text{l}$ , se mezclaron y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 3 a 4 hrs. El ADN finalmente se reprecipitó con etanol. Después se agregaron 20  $\mu\text{l}$  de TE y junto con 5  $\mu\text{l}$  de colorante SGB 5X se mezcló perfectamente; posteriormente la separación de los fragmentos de restricción se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7 %, el corrimiento del gel se verificó entre 15 y 17 hrs. aproximadamente y a 20 mAmps.

#### 3.4.5 Transferencia del ADN genómico a membranas de nylon.

El ADN fragmentado en el gel se desnaturalizó durante 30 minutos en NaOH (0.4 N) y NaCl (0.6 N), siendo el volumen de la solución tres veces la del gel, la neutralización se llevó a cabo durante el mismo tiempo, pero en una solución de TRIS (0.5 M) pH 7.5 y NaCl (1.5 M).

La transferencia del ADN del gel a la membrana de nylon se llevó a cabo durante 16 a 18 hrs. transcurrido este tiempo se checó bajo luz ultravioleta que el gel no conservara ADN. Las membranas se secaron al aire durante 15 a 30 minutos, después en luz ultravioleta y finalmente en una horno a 95 ° C por espacio de 3 a 4 hrs. Como se usaron por primera vez fué necesario lavarlas durante 30 a 60 minutos a 65 ° C en SSC (0.1X) y SDS (0.1 %) en agitación constante. El buffer se calentó a 65 ° antes de colocar las membranas; posteriormente las membranas se secaron al aire y se guardaron en bolsas de plástico adherente a 4 ° C .

#### 3.4.6 Amplificación y marcaje del inserto del plásmido.

Se preparó una mezcla de reacción conteniendo todos los componentes que se indican en el Cuadro 2A, a excepción del plásmido, agregando 20  $\mu$ l de la mezcla a cada tubo y posteriormente se agregaron 5  $\mu$ l de plásmido, se mezcló y se centrifugó brevemente, adicionalmente se colocaron 25  $\mu$ l de aceite mineral ultrapuro, se colocó el tubo sobre el amplificador

PCR (reacción en cadena de la polimerasa), llevándose la amplificación de la siguiente forma:

1 CICLO DE :	30 CICLOS DE :	1 CICLO DE:
94 ° C / 1'	94 ° C / 1'	72 ° C / 1'
	55 ° C / 2'	
	72 ° C / 2'	

Después de lo anterior, la amplificación se verificó con 5  $\mu$ l de cada muestra (1  $\mu$ l de ADN + 1  $\mu$ l de 5X SGB + 3  $\mu$ l de agua destilada), posteriormente se corrió la electrofóresis sobre gel de agarosa al 1 % durante una hora. Finalmente el aceite mineral se removió agregando 25  $\mu$ l de TE + 50  $\mu$ l de cloroformo, se mezcló y se centrifugó para separar la parte acuosa, procediendo con ello a cuantificar el rendimiento del inserto mediante análisis de fluorescencia.

#### 3.4.7 Incorporación de Digoxigenin-d UTP dentro del inserto del plásmido.

Se preparó una mezcla de reacción conteniendo todos los componentes del Cuadro 3A, a excepción del plásmido, se agregaron 90  $\mu$ l de la mezcla a cada tubo y después 10  $\mu$ l de plásmido, se mezcló y se centrifugó, posteriormente se agregaron 75  $\mu$ l de aceite mineral ultrapuro, y el tubo se colocó en el amplificador PCR. La amplificación se llevo a cabo de la siguiente manera:

1 CICLO DE :	25 CICLOS DE :	1 CICLO DE:
94 ° C / 1'	94 ° C / 1'	72 ° C / 1'
	55 ° C / 2'	
	72 ° C / 2'	

La incorporación se verificó de la misma forma que en el caso de la amplificación, el aceite se removió agregando 100  $\mu$ l de cloroformo, se mezcló y se centrifugó la parte acuosa. El rendimiento del inserto se cuantificó usando puntos de fluorescencia y el fago lambda como un estándar.

#### 3.4.8 Hibridación y detección de sondas marcadas.

Las membranas se prehibridaron durante 30 minutos con solución de hibridación (2 ml / 100 cm<sup>2</sup>) a 65 ° C. Posteriormente se desechó esta solución y se agregó 2 ml / cm<sup>2</sup> de la misma solución, pero conteniendo 25 ng / ml de 2.5 % de sondas marcadas con digoxigenin dUTP. Las sondas se desnaturalizaron calentandolas a 95 ° C durante 10 minutos previos a la hibridación. Las sondas marcadas en cada híbrido se indican en el Cuadro. 4.

Después del periodo de hibridación (16 horas), se realizaron los lavados de baja astringencia, estos se hicieron con la solución 0.15X SSC y 0.1 % SDS (0.5 ml/cm<sup>2</sup>) a temperatura ambiente, y los de alta astringencia con la misma solución, pero a 65 ° C. Las membranas se lavaron con buffer 1 y se incubaron en

Cuadro. 4 Relación de locus analizados y alelos detectados mediante PLFR's de tres híbridos de maíz de Valles Altos.

CROMOSOMA	LOCUS	ENZIMA	H I B R I D O S			MEDIA
			H-28	H-30	H-13	
1	BNL 5.62	ECO RI	5	6	4	5.0
	UMC 128	ECO RI	3	2	-	2.5
	UMC 107	HIND III	7	6	4	5.6
	BNL 8.29	HIND III	5	7	2	4.6
2	UMC 53	ECO RI	3	-	-	3.0
	UMC 5	ECO RI	7	-	6	6.5
	UMC 139	ECO RI	5	7	2	4.6
	UMC 137	HIND III	6	5	4	5.0
3	NPI 212	ECO RI	6	6	6	6.0
	UMC 3	ECO RI	4	5	4	4.3
	UMC 39	HIND III	8	6	7	7.0
	UMC 63	ECO RI	-	6	6	6.0
4	UMC 31	HIND III	3	3	2	2.6
	UMC 133	HIND III	5	5	3	4.3
	UMC 15	HIND III	3	3	5	3.6
5	UMC 90	ECO RI	2	3	2	2.3
	UMC 54	HIND III	4	3	2	3.3
6	UMC 21	HIND III	3	5	-	4.0
	NPI 419	HIND III	3	4	-	3.5
7	NPI 400	HIND III	5	4	5	4.6
8	UMC 103	ECO RI	3	3	2	2.6
	BNL 9.44	ECO RI	2	4	-	3.0
	UMC 33	ECO RI	3	2	3	2.6
9	UMC 81	ECO RI	6	4	4	4.6
	UMC 130	ECO RI	-	4	-	4.0
MEDIA			4.3	4.5	3.9	4.2

- Locus no analizados.

buffer 2 durante 30 minutos (5 ml / 100 cm<sup>2</sup>) y después en solución anti-dig durante el mismo tiempo a temperatura ambiente.



posteriormente se realizaron lavados con buffer 2, 1 y 3 a temperatura ambiente. Finalmente las membranas se incuban en solución con AMPPD durante 20 minutos a temperatura ambiente y agitación constante, para después secarse. Las membranas se colocaron en cassetts y se expusieron en películas de rayos X durante la noche, posteriormente las películas se revelaron de la siguiente forma: seis minutos en revelador, treinta segundos en agua, tres minutos en fijador y finalmente se lavaron por tres minutos en agua destilada.

Todos los protocolos utilizados en el análisis PLFR's son descritos por Hoisington (1992).

### 3.4.9 Análisis estadístico

En este estudio se realizaron dos tipos de análisis; el primero referente a la diversidad genética presente entre los materiales involucrados, y el segundo correspondiente a lo que es propiamente la pureza varietal.

#### Diversidad genética.

A partir de una matriz de frecuencias alélicas, se conformo una matriz de distancias genéticas. Las distancias genéticas entre los pares de híbridos se calcularon usando las distancias de GOWER'S (Gower, 1972 ; Goodman, 1973), mediante la siguiente ecuación:

$$D_{ij} = \left[ \sum_{k=1}^{2 \frac{1}{2}} (P_{ik} - P_{jk})^2 \right]^{1/2}$$

Donde  $P_{ik}$  es la frecuencia en el híbrido  $i$ -ésimo del  $k$ -ésimo alelo de un total de 123 encontrados para los 23 loci entre los híbridos analizados. Esta es una distancia euclídeana, que fácilmente puede ser transformada para obtener un rango de 0 a 1, mediante la división de la raíz cuadrada del doble del número de loci, resultando en una distancia de ROGER'S modificada (Rogers, 1979). A partir de ésta última matriz se obtuvo un dendograma.

Pureza varietal.

Con ambas matrices se realizó un análisis de los alelos encontrados en las plantas de los híbridos y que a la vez fueron característicos de los progenitores; adicional a lo anterior se determinó el grado de contaminación alélica (alélos presentes en los híbridos, pero no en los progenitores) presente en cada uno de los híbridos analizados. Así mismo se construyó una matriz de correlación a partir de las frecuencias alélicas para efectuar un análisis de componentes principales.

#### IV RESULTADOS.

##### 4.1 Calidad física de las semillas.

En el Cuadro. 5 se exponen los resultados de las diferentes determinaciones realizadas a las 14 muestras primarias de semilla. En él, se observan diferencias interesantes hacia el interior de cada uno de los híbridos y respecto a sus dos orígenes de producción .

La VS-22 muestra algunas diferencias entre uno y otro origen: el peso volumétrico para este genotipo favorece a INIFAP por 2.4 %, la semilla de PRONASE pesa 8.3 % más y para éste genotipo la cantidad de semilla favorece débilmente al origen INIFAP (2 %), además este último origen tiene 5 % de más semilla, tanto chica como mediana, pero 10 % menos de semilla grande.

Para H-28, el origen INIFAP posee un 10.5 % de mayor peso volumétrico, para el caso del peso de mil semillas y de la pureza de semilla realmente no es apreciable alguna diferencia (no se rebasa en ambos casos al 2 %); respecto a los tamaños de semilla se observa que el tamaño intermedio (0.7 cm) guarda aproximadamente la misma proporción aunque se presenta 5 % de diferencia a favor de PRONASE; así mismo PRONASE tiene menos semilla chica (12 %) y más semilla grande (7 %).

En el caso de H-30 el peso volumétrico es el mismo, pero el

Cuadro. 5 Características físicas de las muestras de semilla utilizadas en el presente estudio

HIBRIDO O VARIEDAD	PEVO ( gr/lit )	P100 ( gr )	SEMILLA PURA ( % )	IMPUREZAS ( % )	PROPORCION DE TAMAOS ( % )		
					0.6 cm	0.7 cm	0.8 cm
VS-22 INIFAP	768	310	94	6	20	70	10
VS-22 PRONASE	750 (2.4-I)	336 (8.3-P)	92 (2.0-I)	8 (2.0-P)	15 (5.0-I)	65 (5.0-I)	20 (10.0-P)
H-28 INIFAP	791	275	95	5	50	40	10
H-28 PRONASE	716 (10.5-I)	278 (1.1-P)	97 (2.0-P)	3 (2.0-I)	38 (12.0-)	45 (5.0-P)	17 (7.0-P)
H-30 INIFAP	736	319	99	1	17	66	17
H-30 PRONASE	736 (0.0)	358 (12.2-P)	98 (1.0-I)	2 (1.0-P)	20 (3.0-P)	45 (21.0-I)	35 (18.0-P)
H-129 INIFAP	707	283	98	2	17	19	64
H-129 PRONASE	750 (6.1-P)	330 (16.6-P)	98 (0.0)	2 (0.0)	24 (7.0-P)	24 (5.0-P)	52 (12.0-I)
H-135 INIFAP	811	269	90	10	24	63	13
H-135 PRONASE	806 (0.6-I)	459 (71.3-P)	99 (8.0-P)	2 (8.0-I)	9 (24.0-)	12 (51.0-I)	88 (75.0-P)
H-311 INIFAP	776	306	99	1	10	20	70
H-311 PRONASE	763 (1.7-I)	356 (16.3-P)	95 (4.0-I)	5 (1.0-I)	0 (10.0-)	25 (5.0-P)	75 (5.0-P)
HV-313 INIFAP	762	304	95	5	3	15	82
HV-313 PRONASE	771 (1.2-P)	288 (5.5-I)	96 (1.0-P)	4 (1.0-I)	0 (3.0-I)	10 (5.0-I)	90 (8.0-P)

PEVO = Peso volumetrico.

P1000 = Peso de 1000 semillas.

Las cantidades entre parentesis, se refieren a diferencias en porcentaje, la letra I indica a favor de INIFAP, en tanto que la letra P lo hace a favor de PRONASE.

peso de mil semillas favorece a PRONASE con un 12.2 %; nuevamente la pureza en ambos orígenes es buena y sin diferencia apreciable. Así mismo el origen INIFAP tiene 21.0 % de más semilla mediana, 3.0 % menos de semilla chica y 18.0% de menor cantidad de semilla grande.

En el caso del H-129, el origen PRONASE cuenta con 6 % de mayor peso volumétrico, 16.6 % de más peso de mil semillas, igual contenido de pureza física, más proporción de semilla chica (7 %) y mediana (5 %) , pero menos semilla grande (12.0 %).

El trilineal H-135 se presenta como uno de los más apreciables respecto a algunas diferencias por concepto de origen, como es el caso del peso de mil semillas (71.3 % de mayor peso en PRONASE) o la mayor proporción de semilla grande (75 %) y más cantidad de semilla pura (8 %).

El H-311, también guarda algunas diferencias entre orígenes: en peso volumétrico se favorece a INIFAP con 1.7 % por arriba de PRONASE, en peso de mil semillas PRONASE se halla por arriba de INIFAP (16.3 %), en la pureza de semilla tienen buena calidad ambos orígenes, pero aún es mejor la expresión de INIFAP (4.0 %). En los tamaños de semilla, ambos orígenes tienen altas proporciones de semilla grande (70 % y 75 % para INIFAP y PRONASE , respectivamente).

Para el HV-313 el origen PRONASE tuvo mayor peso volumétrico (1.2 %) menor peso de mil semillas (5.0 %) más semilla pura (1.0 %), nada de semilla chica, 10 % de semilla mediana y 90 % de semilla grande.

#### 4.2 Calidad fisiológica de la semilla.

En el Cuadro. 6 se presenta la información concentrada de las medias de las variables de respuesta en cada uno de los tratamientos en forma pareada, también la diferencia en porcentaje que guarda una media con respecto a otra, así mismo se señala que origen se ve favorecido, y en que casos resulta con significancia la prueba "t" de student.

En este cuadro, se observa que para los tratamientos pareados del genotipo VS-22, existen diferencias significativas al 1 % de probabilidad en VE y PSPA para el origen INIFAP. También aparecen diferencias significativas al 5 % de probabilidad en: PSRS (a favor de PRONASE) y PSC (a favor de INIFAP).

Respecto a las muestras pareadas del genotipo H-28 sólo hubo significancia estadística en VE (\*) y PSC (\*\*); sin embargo también existe mejor comportamiento fisiológico en el origen INIFAP.

Cuadro. 6

Medias de tratamientos y sus diferencias (%) para cada variable evaluada en invernadero y para cada par de orígenes por genotipo.

TRATAMIENTOS PAREADOS		MEDIAS DE TRATAMIENTOS Y DIFERENCIAS							
	VE (AD)	GER (%)	FSPA (gr)	PSR (gr)	PSRS (g)	IEF (%)	MS/PL (g)	FSC (g)	
VS-22 INIFAP	14.86	74.50	12.84	3.90	83.50	109.6	334.0	284.0	
VS-22 PRONASE	6.87 (116.3-I)	70.00 (4.5-I)	8.25 (55.6-I)	3.55 (9.9-I)	124.10 (48.6-P)	103.8 (5.2-I)	236.0 (41.5-I)	225.0 (26.2-I)	
	**	NS	**	NS	*	NS	NS	*	
H-28 INIFAP	14.51	56.00	12.44	3.25	87.37	142.62	287.7	201.0	
H-28 PRONASE	11.68 (24.2-I)	50.00 (6.0-I)	9.45 (31.6-I)	3.94 (17.6-P)	96.00 (9.8-P)	148.08 (5.5-P)	262.2 (21.1-I)	176.7 (13.7-I)	
	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	
H-30 INIFAP	16.21	81.00	11.28	4.13	65.40	122.70	306.0	252.5	
H-30 PRONASE	9.42 (72.0-I)	66.00 (15.0-I)	11.01 (2.5-I)	5.75 (39.2-P)	115.40 (76.5-F)	136.84 (14.1-P)	335.0 (5.8-P)	256.5 (1.6-F)	
	*	*	NS	**	**	NS	NS	NS	
H-129 INIFAP	11.03	58.00	7.81	3.25	97.82	108.0	223.1	184.0	
H-129 PRONASE	11.35 (2.9-P)	37.50 (20.5)	6.51 (20.0-I)	2.57 (30.4-I)	115.10 (17.6-F)	119.3 (11.3-F)	182.0 (22.6-I)	216.0 (17.9-F)	
	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	
H-135 INIFAP	13.51	64.50	7.01	4.57	69.85	91.16	231.5	230.0	
H-135 PRONASE	12.05 (12.1-I)	49.00 (15.5-I)	10.97 (56.0-P)	4.83 (5.7-P)	95.32 (36.5-P)	70.20 (21.0-I)	315.7 (36.4-P)	343.7 (49.5-F)	
	NS	*	NS	NS	*	NS	NS	**	
H-311 INIFAP	7.30	42.50	6.67	5.44	114.12	143.12	244.8	186.3	
H-311 PRONASE	5.90 (23.7-I)	25.00 (17.5-I)	6.80 (2.0-P)	6.20 (14.0-P)	111.50 (2.3-I)	105.72 (37.2-I)	263.0 (7.43-P)	253.5 (36.0-I)	
	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
HV-313 INIFAP	8.52	74.00	8.37	5.96	111.07	127.70	284.6	244.6	
HV-313 PRONASE	5.58 (52.7-I)	73.50 (0.5-I)	6.65 (25.9-I)	4.68 (24.4-I)	114.08 (2.7-P)	107.50 (29.2-I)	228.7 (24.4-I)	212.0 (15.4-I)	
	**	NS	**	NS	NS	NS	*	*	

Las cantidades entre parentesis se refieren a diferencias en porcentaje, la letra I indica a favor de INIFAP, en tanto que la letra P lo hace a favor de PRONASE.

Las abreviaturas se refieren a: VE = velocidad de emergencia, AD = unidades adimensionales. GER = porcentaje de germinación. FSPA = peso seco de la parte aérea, PSR = peso seco de raíz, IEF = índice de eficiencia, MS/PL = materia seca por planta y peso seco consumido.

La significancia estadística de las diferencias es en base a la "t" de student y son al 5%, 1% y no significativas.

Para el caso del H-30, existieron diferencias significativas al 5 % de probabilidad estadística en VE y GER; así mismo, los parámetros primarios de calidad fisiológica (VE y GER) favorecen a INIFAP, y los restantes lo hacen hacia PRONASE.

El pareamiento entre orígenes del H-129, mostraron diferencias poco apreciables, de todas las variables consideradas, sólo se observó significancia estadística en PSR(\*); no obstante GER, PSPA, PSR Y MS/PL favorecen al origen INIFAP.

En los tratamientos pareados del H-135 las pruebas de "t", detectaron significancia estadística en GER (\*), P9RS (\*\*) y PSC (\*). Los dos últimos parámetros junto con PSPA, PSR y MS/PL favorecieron al origen PRONASE, adicionalmente se observa que la VE y el IEF favorecieron a INIFAP.

Para el caso de los orígenes pareados del H-311, se obtuvo diferencia significativa sólo en VE (\*\*), y que junto a GER e IEF se obtuvo mejor expresión en INIFAP

Finalmente los tratamientos pareados del HV-313 muestran cuatro variables en las cuales hubo diferencias estadísticamente significativas: VE (\*\*), PSPA (\*\*), MS/PL (\*), PSC (\*). Junto con aquellas donde no hubo diferencias estadísticas significativas, confieren a INIFAP mayor calidad fisiológica.



#### 4.3 Evaluación de la pureza varietal en base al comportamiento fenológico y componentes del rendimiento (grow-out).

En el cuadro. 7 se presentan las medias de todos los tratamientos involucrados en campo; además se indican las diferencias en porcentaje para cada variable analizada y para cada par de orígenes por genotipo. De acuerdo con lo antes señalado, se observa que para la muestra pareada :

##### VS-22.

El Cuadro. 7, indica que entre orígenes de producción existen diferencias altamente significativas para las variables REN, HPM, GPH y DIO, así mismo muestra diferencias significativas en P200. En general el origen PRONASE posee un mejor desempeño fisiológico.

##### H-28.

Los orígenes pareados de este híbrido, sólo tienen dos variables con diferencias altamente significativas: AFO y HPM, y dos con diferencias significativas: REN y ALM. Los rasgos fenotípicos dan al origen INIFAP una tendencia de mejor expresión fisiológica.

##### H-30.

Los tratamientos pareados de este genotipo, sólo en cinco variables resulta significativa la prueba "t" de student al 5 %:

Cuadro. 7 Métodos de tratamientos y sus diferencias (%) Para cada variable evaluada en Chapoy para cada par de orígenes por genotipo.

TREATAJOS PAREADOS	REN (kg/ha)	PO (c2)	ACA (t)	P204 (gr)	PEVO (gr/t)	LEI (ca)	ALP (ca)	ALR (ca)	LVA (ca)	SDI (ca)	NSE (t)	GM (t)	HRN (t)	EPH (t)	NEO (t)	RS (t)	DID (ca)	FRS (dis)	FFED (dis)	MO (dis)	
V5-22	INDIF	8173	631	6,62	66,6	795	45	273	163	12,8	4,7	96,1	89,7	16,5	27,8	16,9	4,75	2,22	85,5	93,6	13,7
V5-22	PROMISE	8994	676	8,38	72,4	885	44	227	127	13,8	5,8	82,3	89,7	19,8	28,7	28,2	5,58	2,27	83,7	93,8	12,7
		(18,4-P)	(7,1-P)	(2,3-P)	(9,8-P)	(1,2-P)	(2,7-P)	(28,3-P)	(7,8-P)	(6,4-P)	(3,3-P)	(8,8)	(15,2-P)	(6,2-P)	(11,2-P)	(12,4-P)	(2,2-P)	(0,2-P)	(8,2-P)	(6,5-P)	(8,4)
		**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
H-26	INDIF	6422	549	3,50	62,7	811	71	236	124	15,1	4,8	86,7	89,2	26,0	28,8	18,2	4,50	2,32	86,8	97,5	14,5
H-26	PROMISE	5958	462	3,98	64,5	866	66	222	127	13,6	4,7	85,3	87,8	17,5	27,2	21,3	5,25	2,22	86,8	93,8	13,5
		(7,8-P)	(18,8-P)	(5,9-P)	(2,8-P)	(6,6-P)	(7,5-P)	(1,7-P)	(18,5-P)	(1,8-P)	(2,1-P)	(1,4-P)	(1,4-P)	(14,3-P)	(6,4-P)	(21,1-P)	(16,4-P)	(4,5-P)	(8,1)	(4,8-P)	(7,4-P)
		*	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
H-34	INDIF	8813	582	12,4	75,1	795	46	243	138	15,2	5,3	84,6	89,6	21,8	21,5	21,2	5,29	4,48	83,5	95,8	15,8
H-34	PROMISE	8533	513	4,22	66,2	840	48	256	154	12,8	5,6	83,6	86,8	18,8	26,2	25,8	4,25	4,28	83,8	91,2	13,7
		(22,5-P)	(13,4-P)	(7,9-P)	(12,3-P)	(6,6-P)	(4,3-P)	(5,4-P)	(11,6-P)	(13,3-P)	(5,6-P)	(1,8-P)	(8,8-P)	(16,6-P)	(28,3-P)	(13,8-P)	(24,5-P)	(4,8-P)	(6,4-P)	(4,2-P)	(9,5-P)
		*	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**	*	**	*	**	**	**	**	**	**
H-129	INDIF	7429	554	4,57	77,3	798	46	271	155	17,1	5,2	81,3	86,6	18,8	28,78	32,1	3,75	2,32	94,5	99,2	16,2
H-129	PROMISE	6782	632	8,87	72,2	787	58	257	132	15,9	4,9	82,7	86,1	16,5	29,58	17,8	4,25	2,38	94,7	104,8	15,7
		(8,2-P)	(18,8-P)	(4,2-P)	(9,9-P)	(1,4-P)	(8,7-P)	(5,4-P)	(1,9-P)	(7,5-P)	(8,1-P)	(1,4-P)	(8,7-P)	(8,1-P)	(4,2-P)	(14,3-P)	(13,3-P)	(1,2-P)	(4,4-P)	(4,8-P)	(3,2-P)
		*	**	**	**	**	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**	**	**	**	**	*
H-125	INDIF	7998	635	2,48	78,6	821	44,2	267	160	15,2	4,8	72,2	88,6	17,5	26,2	32,8	15,7	2,57	99,8	189,2	22,3
H-125	PROMISE	7530	697	6,11	83,8	838	58,7	268	148	16,9	5,3	81,2	89,1	16,5	33,5	32,2	12,5	2,63	94,2	162,3	16,8
		(6,1-P)	(3,8-P)	(13,4-P)	(15,1-P)	(1,1-P)	(14,7-P)	(2,7-P)	(8,1-P)	(11,2-P)	(18,4-P)	(9,8-P)	(6,5-P)	(6,1-P)	(18,9-P)	(1,2-P)	(18,1-P)	(3,1-P)	(5,1-P)	(6,5-P)	(9,4-P)
		*	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
H-311	INDIF	5189	628	2,68	62,5	576	39	191	128	14,2	4,9	83,8	84,7	15,8	21,5	25,6	16,5	2,87	99,7	118,2	16,7
H-311	PROMISE	4989	569	8,98	71,5	813	42	177	113	15,6	5,1	81,1	86,4	15,8	28,6	27,6	15,5	2,85	118,8	118,8	16,5
		(4,8-P)	(18,5-P)	(2,8-P)	(14,4-P)	(8,4-P)	(7,1-P)	(7,9-P)	(15,8-P)	(9,8-P)	(4,1-P)	(1,3-P)	(1,7-P)	(6,7-P)	(21,2-P)	(2,8-P)	(6,8-P)	(8,7-P)	(1,3-P)	(6,2-P)	(12,2-P)
		**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
H-312	INDIF	5998	635	5,28	81,2	845	46	184	95	15,2	4,9	84,9	82,2	15,8	22,8	15,8	15,8	2,98	99,2	187,8	16,5
H-312	PROMISE	3227	575	8,48	57,1	831	49	227	125	14,2	4,7	82,1	82,8	15,8	28,6	22,8	12,7	2,82	97,2	186,8	15,5
		(14,8-P)	(18,4-P)	(3,4-P)	(17,2-P)	(1,7-P)	(6,3)	(22,4-P)	(21,4-P)	(7,8-P)	(4,2-P)	(1,2-P)	(8,2-P)	(6,4-P)	(12,8-P)	(7,4-P)	(15,3-P)	(2,8-P)	(2,8-P)	(3,2-P)	(6,5-P)
		**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**

Las diferencias entre parcelas muestran diferencias expresadas en porcentaje; la letra I, indica diferencias a favor de INDIF, en tanto que la letra P lo hace a favor de PROMISE.

Las abreviaturas citadas se refieren a: REN = Rendimiento en grano; MO = Masa total; MS = Acum. P204 = peso de 200 grano; PEVO = Peso volúmico; LEI = Longitud del eje central de la espiga; ALP = Altura de planta; ALR = Altura de mazorca; LVA = Longitud de mazorca; SDI = Número de mazorcas; NSE = Porcentaje de mazorcas de alta; HRN = Porcentaje de grano en la mazorca; EPH = Número de hilos por mazorca; EPH = Número de hilos por mazorca; NEO = Porcentaje de mazorcas secundarias; RS = Número de mazorcas secundarias en la espiga; DID = Tipo de dicitos; FRS = Dicitos a floración masculina; FFED = Dicitos a floración femenina; MO = Número de hilos.

La significancia estadística de las diferencias se muestra: no significativa (NS), al 5% (P) y al 1% (\*\*).

REN, ALM, LMA, HPM y MPD. Igualmente existe una mejor expresión de los caracteres morfofisiológicos en el origen INIFAP.

H-129.

Para este genotipo, la prueba "t" de student, detectó en los orígenes pareados diferencia significativa en: REN, PEVO, CGM, FMAS, FFEM y NHO. Nuevamente el origen INIFAP se comportó con mejor calidad fisiológica, pues sus componentes de rendimiento se expresaron mejor.

H-135.

Este genotipo, en sus orígenes pareados tiene diferencias significativas (\*) en cinco variables : REN, ALM, LMA, DIM y RAS. Además la mayoría de las componentes de rendimiento que están altamente correlacionadas con el rendimiento de grano, indican una mejor expresión morfofisiológica en el origen PRONASE.

H-311.

Entre los tratamientos pareados de este genotipo, la prueba estadística detectó diferencias al 5 % en las variables P200 Y LMA. Sin embargo, las demás variables analizadas favorecen al origen INIFAP.

HV-313.

Entre los orígenes de producción de este genotipo la "t" de student, detectó diferencias altamente significativas en REN y AFO, en tanto que las variables: P200, PEVO, LMA, MSE, y MPO presentan diferencias al 5 % de probabilidad estadística. De igual manera el mejor desempeño morfofisiológico se registro en el origen INIFAP.

#### 4.4 Evaluación molecular de la pureza varietal, mediante PLFR's.

##### 4.4.1 Análisis de diversidad genética .

En éste análisis se contemplaron los alelos presentes en cada uno de los híbridos (de los dos orígenes involucrados), pero que además fueran característicos de las líneas progenitoras. Cada una de las 25 sondas de ADN en combinación con la enzima de restricción respectivamente utilizada, e indicadas en el Cuadro. 4, revelaron polimorfismo en cuando menos uno de los híbridos. De ésta manera, un total de 123 alelos de PLFR's fueron detectados. El máximo número de alelos detectados por una combinación sonda-enzima fué de 8 (UMC 39 / Hind III) en el H-28 (Cuadro. 4). Así mismo, se encontró variación en el polimorfismo por cromosoma; en el cromosoma 3, se presentó el mayor número promedio de alelos (5.8), ocurriendo lo contrario en el cromosoma 8 (2.7). Con respecto a los híbridos, el H-30 tuvo un valor de 4.5 alelos en promedio. El valor promedio general de polimorfismo detectado con las 25 sondas de ADN y en combinación con la enzima utilizada fué de 4.2 alelos.

En el Cuadro. 8, se presenta la matriz de distancias genéticas conformada a partir de la matriz de frecuencias alélicas, en ella se aprecia que el valor más bajo es de 0.173,

Cuadro. 8 Matriz de distancias genéticas para tres híbridos de maíz de Valles Altos producidos por INIFAP (I) y PRONASE (P).

	H-28	H-28 P	H-30 I	H-30 P	H-135	H-135 F
H-28 I	0.0					
H-28 P	0.359	0.0				
H-30 I	0.721	0.656	0.0			
H-30 P	0.727	0.665	0.301	0.0		
H-135 I	0.773	0.732	0.782	0.794	0.0	
H-135 P	0.762	0.716	0.776	0.78	0.173	0.0

correspondiendo a las muestras del híbrido H-135, ocurriendo lo contrario en el H-28 (0.359). En la Figura. 1, se representa gráficamente los agrupamientos generados a partir de esta matriz, en dicha figura se destaca la mayor similaridad dentro de cada subgrupo en particular (H-28, H-30 y H-135) y respecto a sus propios orígenes de producción. Así mismo se puede apreciar el grado de diversidad entre los diferentes subgrupos, resultando mayor diversidad, cuando menor presencia de líneas progenitoras se tengan en común.

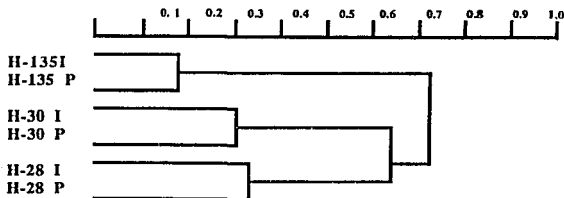


Figura 1. Dendrograma de distancias genéticas de tres híbridos de maíz producidos por INIFAP (I) y PRONASE (P)

Los resultados del análisis de componentes principales, a partir de la matriz de correlación de datos de PLFR's son presentados en la Figura. 2.

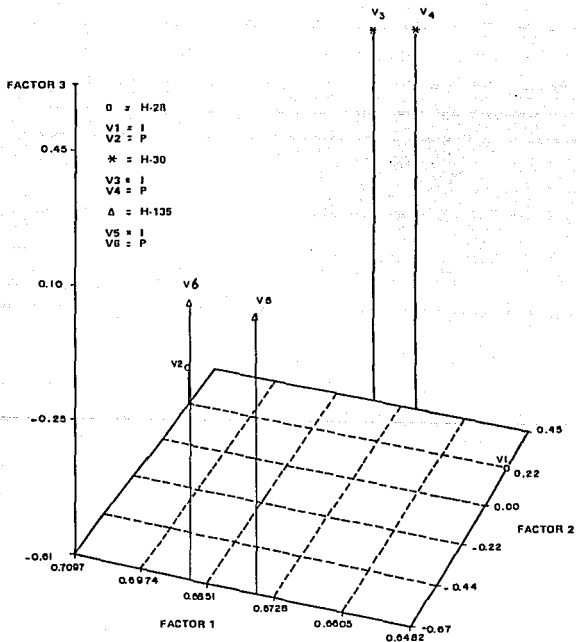


Figura 2. Análisis de componentes principales a partir de matriz de correlación de frecuencias alélicas de tres híbridos de maíz con diferente origen de producción.

En esta figura es posible apreciar que el primer, segundo y tercer componente principal explican un 46 %, 22 % y 17 %, respectivamente, de la variación total.

#### 4.4.2 Análisis de pureza varietal .

Dentro de este análisis se involucró a todos aquellos alelos que se detectaron en los híbridos de ambos orígenes y que no se detectaron en sus respectivas líneas progenitoras de origen INIFAP. En el Cuadro. 9 se presenta el número de plantas (en porcentaje) de cada híbrido por origen de producción, en los cuales se encontró por lo menos un alelo "extraño" (alelo no portado en los progenitores, pero presente en los híbridos).

Cuadro. 9 Plantas (%) con alelos extraños en genotipos de maíz producidos por INIFAP y PRONASE.

LOCUS	H-28		H-30		H-135	
	INIFAP	PRONASE	INIFAP	PRONASE	INIFAP	PRONASE
UMC 107	12.5	0.0	-	-	-	-
BNL B.29	0.0	12.5	-	-	-	-
UMC 139	0.0	75.0	0.0	37.5	12.5	0.0
UMC 137	0.0	12.5	62.5	62.5	12.5	12.5
NPI 212	12.5	37.5	0.0	12.5	-	-
UMC 39	0.0	25.0	-	-	-	-
UMC 31	0.0	12.5	0.0	12.5	-	-
UMC 133	0.0	37.5	0.0	37.5	0.0	12.5
UMC 90	12.5	0.0	12.5	37.5	-	-
UMC 21	0.0	12.5	0.0	75.0	-	-
NPI 419	0.0	37.5	0.0	12.5	-	-
UMC 3	-	-	25.0	75.0	-	-
UMC 63	-	-	0.0	12.5	0.0	12.5
UMC 15	-	-	-	-	0.0	12.5

- Locus no analizados

En el caso del H-28 de PRONASE, el mayor porcentaje de plantas (75 %), presentó uno o dos alelos "extraños" en el locus UMC 39, mientras que en el H-30 esto mismo ocurrió, pero en el locus UMC 21.

El menor porcentaje de plantas con alelos "extranos" se presentó en el H-135. En términos generales los resultados que exhiba la Figura. 3 muestran un mayor número de locus con presencia de tales alelos extraños en los híbridos producidos por PRONASE.

La localización cromosómica de las diferencias mencionadas se esquematizan en la Figura. 4.

En esta figura se observa que el H-28 de PRONASE difiere en nueve locus, en tanto que el H-28 de INIFAP sólo lo hace en tres, localizandose estas contaminaciones en seis de los diez cromosomas del maíz; para el caso del H-30 de PRONASE existe presencia de alelos extraños en diez locus y en el H-30 de INIFAP sólo es en tres, dichas diferencias se localizan unicamente en cinco cromosomas. Finalmente el H-135 presenta diferencias entre orígenes de producción en cinco locus de tres cromosomas.



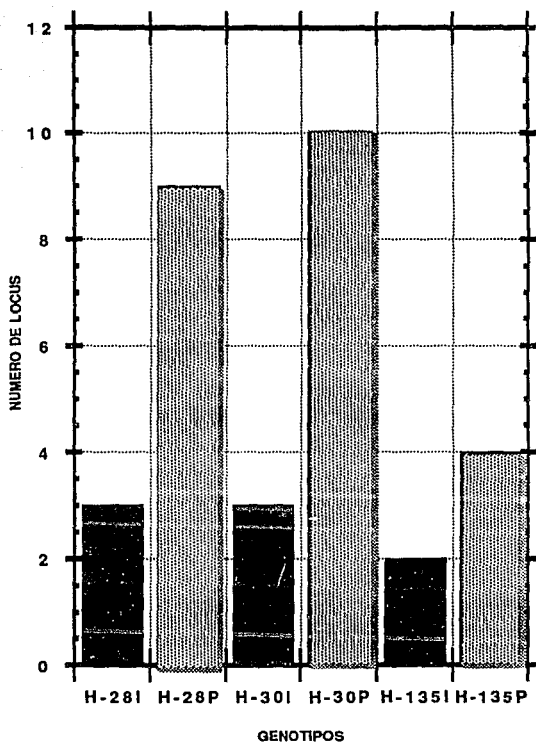


FIGURA 3. NUMERO DE LOCUS CON DIFERENCIAS ALELICAS RESPECTO A LOS ALELOS PRESENTES EN LAS LINEAS PROGENITORAS DE INIFAP

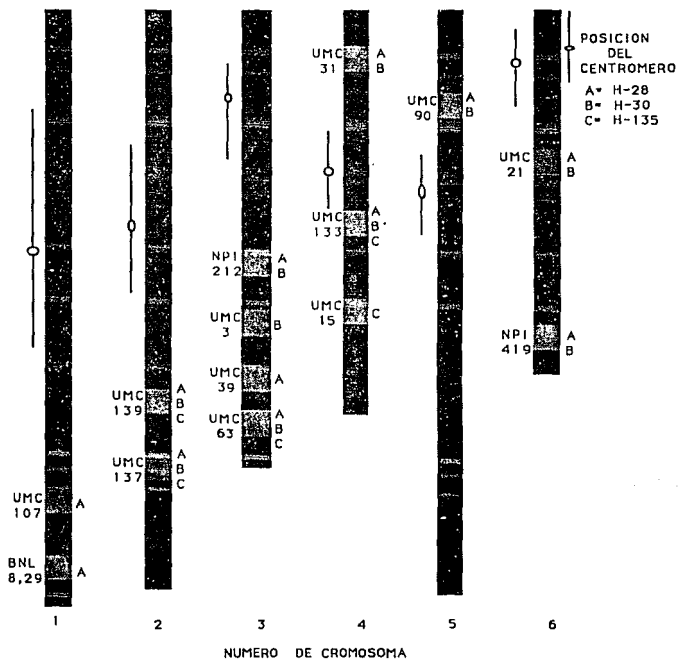


FIGURA 4. LOCALIZACION CROMOSOMICA DE LAS DIFERENCIAS DETECTADAS POR RFLP'S EN HIBRIDOS DE MAIZ PRODUCIDOS POR INIFAP Y PRONASE. LA POSICION DE LA LETRA NO TIENE RELACION CON EL GRADO DE LAS DIFERENCIAS

## V DISCUSION.

### 5.1 Calidad de las semillas con diferente origen de producción.

La expresión fenotípica final de una semilla, es función de tres elementos: genotipo, ambiente e interacción genotipo-ambiente (Márquez, 1985). En estos términos, cuando una semilla llega a manos del agricultor, lleva consigo los efectos del conjunto de actividades y condiciones a las que voluntaria o accidentalmente fué sometida (Moreno, 1984). Tales efectos, se traducen en un potencial agronómico que se manifestará a través de su desarrollo biológico.

Cuando se habla de semillas mejoradas, inevitablemente es asociado el concepto de calidad de semilla, que por si mismo indica el estado general de excelencia en una semilla para reproducir un cultivo, manteniendo las características agronómicas deseables a través de los ciclos de incremento de semillas. En la práctica es difícil lograr esta excelencia, sin embargo conociendo este concepto es posible desarrollar metodologías apegadas que aseguren al menos la máxima calidad posible (Irastorza, 1991).

Con base a los comentarios anteriores, a continuación se discuten los diferentes componentes de la calidad en la semilla de los orígenes involucrados en el presente estudio.

#### CALIDAD FISICA.

Los resultados de esta determinación están resumidos en el Cuadro. 5; en él se observa que todas las muestras de semilla reúnen buena calidad física respecto a la semilla pura (que para efectos de certificación es uno de los más requeridos). Aunque es común la ubicación de este parámetro por arriba del 90 % en maíz, esto sólo indica un buen manejo en la separación de impurezas. Por ello no existen diferencias apreciables entre orígenes, debido quizá a la naturaleza propia del carácter evaluado.

Respecto al peso de mil semillas, en el Cuadro. 5; se aprecia una tendencia de mejor expresión de ésta cualidad en genotipos de origen PRONASE; lo cual podría atribuirse a un mejor ambiente de multiplicación, tanto de lugar como de año, esto es posible, debido a que este parámetro asociado a características varietales (FAO, 1978) es fuertemente afectado por el ambiente de producción (Garay, 1983; Tekrony y Egli, 1991), y al respecto el Cuadro. 2 indica que los orígenes difieren tanto en año como en lugar de producción. Es importante señalar que dentro de este parámetro los orígenes pareados del H-135 difieren fuertemente y en el cual se ve favorecido el origen PRONASE. Tal condición se puede atribuir a la procedencia del H-135 de INIFAP, el cual fue producido en un lugar poco apropiado (Espinosa y Carballo, 1987) ya que el año de producción es el mismo.

El peso volumétrico es otro elemento de la calidad física, aunque no tan importante como los dos anteriores, en el cual

existe una tendencia de mayor peso volumétrico en el origen INIFAP, propiciado posiblemente por una mayor proporción de semilla chica, el caso más acentuado en este parámetro es para los orígenes pareados del H-28.

El parámetro de la proporción de tamaños, es quizá un elemento de atracción estética en términos de calidad; aunque no necesariamente la semilla más grande es la mejor para el establecimiento en campo (Tekrony y Egli, 1991), si resulta atractiva con fines comerciales. En términos generales existe mayor proporción de tamaño grande en el origen PRONASE, incluso en los genotipos: H-135, H-311 y HV-313 no existe semilla chica.

En general, aunque la semilla de origen INIFAP no se encuentra por abajo de los estándares comerciales de calidad física, si es superado por el origen PRONASE. Esto quizá se deba a que PRONASE tradicionalmente ha contado con equipo necesario para beneficiar a la semilla (Barkin y Suárez, 1983).

#### CALIDAD FISIOLÓGICA.

Según el Cuadro. 6. los parámetros utilizados son propios de pruebas de vigor (Santiago, 1988). Este Cuadro hace un concentrado de todo el trabajo realizado en invernadero para efectos de calidad fisiológica.

Así, para velocidad de emergencia (VE), se aprecia una tendencia hacia el origen INIFAP de mejor desempeño fisiológico. Esta condición posiblemente se deba a que los genotipos de origen INIFAP sean más recientes (Cuadro. 2); ya que según Moreno (1984) la edad de la semilla afecta a su calidad fisiológica. Un comportamiento similar se observa para el parámetro de germinación, que aunque sólo para dos casos resultan diferencias significativas, el origen INIFAP posee mayor calidad fisiológica.

El aspecto de la germinación (%) en medios óptimos siempre ha sido discutido (Sayers, 1982; Irastorza, 1991), ya que algunos lotes de semilla pueden germinar rápidamente bajo condiciones ideales, pero pueden hacerlo muy mal en el campo; comúnmente en México, este es un parámetro muy utilizado para acreditar rasgos de calidad fisiológica, sin embargo es poco confiable. En los términos del presente estudio, la profundidad de siembra trató de darle limitación a la prueba de germinación (sin embargo, la semilla en el campo queda a profundidades variables); lo cual parece haber dado el efecto esperado, pues todos los porcentajes de germinación se hallan por abajo del requerimiento comercial (85 %). Así mismo existe un mejor desempeño fisiológico en todos los genotipos de origen INIFAP; incluso en los orígenes pareados del H-135 es más evidente la inconsistencia que guarda la calidad física con la calidad fisiológica, pues apesar que la semilla de PRONASE es más pesada (y por ende más grande) no mostró relación con su poder de germinación respecto a su similar de origen INIFAP, donde este último lo superó con un 15 % de mayor

germinación; lo cual indica que el desempeño de una semilla en campo (por lo menos hasta su establecimiento) no siempre depende del peso o del tamaño de la semilla, sino más bien del potencial metabólico interno de la semilla, mismo que es dictado por las características genéticas del genotipo (USDA, 1988).

Otro aspecto importante de la calidad fisiológica es la cantidad de materia seca por planta, pues resulta como una medida práctica de la actividad metabólica, lo cual es muy importante una vez que la planta se ha establecido, ya que a partir de ese momento la planta mejor dotada de estructuras morfofisiológicas se destacará en su desarrollo (Tanaka y Yamaguchi, 1977). Este parámetro conllevó a considerar la expresión del peso seco de la parte aérea (PSPA) y del peso seco de la raíz, ambas estructuras son igualmente importantes para el subsiguiente desarrollo vegetativo, lo cual ha sido plenamente establecido por Evans (1967), pues en general una mayor proporción de superficie radicular implica un mayor volumen de suelo explorado, y que en forma interactiva con una mayor superficie fotosintética en la parte aérea proporciona un mejor desarrollo posterior al establecimiento en campo.

En el caso del mayor PSPA se observa en el Cuadro. 6 una tendencia de mejor calidad fisiológica en el origen INIFAP, y sólo en los tratamientos pareados del genotipo H-135 y H-311 se ve favorecido el origen PRONASE, ello quizá se deba a un mayor peso de la semilla (Santiago, 1988).

Respecto al peso de raíz las diferencias no muestran una tendencia clara, lo cual puede ser atribuible a características propias de cada genotipo. Finalmente el índice de eficiencia (IEF) resume el comportamiento del peso seco de los restos de semilla (PSRS) en consecuencia del peso consumido (PSC). En el Cuadro. 6 se observa que el origen PRONASE tiende a generar un mayor PSRS, pero según el IEF, el origen INIFAP tiene mejor desempeño de su calidad fisiológica. En consecuencia se aprecia que la mayor proporción de reservas nutrimentales en la semilla más grande, no influye en el desempeño fisiológico de la misma.

#### CALIDAD GENETICA.

La calidad genética de una semilla, inevitablemente es asociada al nivel de pureza e identidad varietal respecto a un genotipo previamente establecido. Para efectos de pureza varietal, en muchos países (sobre todo desarrollados) es común la práctica del grow-out, que por sí misma constituye la prueba estandar de verificación genética. En cualquier cultivo esta prueba presupone la existencia de una descripción varietal (Irastorza, 1991). Entre los parámetros descriptivos deben diferenciarse aquellos que son fijos (cualitativos) de los que son variables (cuantitativos); los primeros dependen de uno o de pocos genes y son poco afectados por el ambiente, en tanto que los segundos resultan de una acción poligénica y son más afectados por el ambiente.



Las pruebas de verificación genética grow-out son particularmente útiles en países donde los esquemas genéticos de sus semillas mejoradas involucran la utilización de materiales con estado avanzado de homocigocis, tal es el caso de los Estados Unidos, cuyas líneas endogámicas mínimamente portan un estado de S-9 (Márquez, 1985).

En México, ésta práctica no es común en cultivos halogamos como el maíz, debido quizá a los esquemas genéticos presentes en las líneas progenitoras, pues estas no rebasan el estado S-4 (CEVAMEX, 1986). Lo cual es patente en los patrones fenotípicos de los híbridos y variedades mejoradas utilizadas en el presente estudio.

En el Cuadro. 7 se presenta un resumen de las medias de tratamientos para cada variable analizada en campo. Todos los parámetros son de origen poligénico, es decir influenciados por el ambiente; por otro lado actualmente no se cuenta con una descripción varietal (al menos completa) para cada uno de los genotipos presentados en el Cuadro.7, dichas descripciones, incluyen sólo características útiles para su promoción comercial (Orozco, 1986). Lo anterior hace particularmente difícil la determinación de la pureza varietal a nivel de campo. Sin embargo la determinación hecha con los marcadores genéticos moleculares (PLFR's), hizo posible que en algunos casos la verificación genética fuera exhaustiva y complementaria; quedando así en el

otro extremo sólo la descripción del mejor desempeño morfofisiológico entre los orígenes de producción pareados.

Con base a lo anterior el análisis PLFR's indica mayor pureza varietal en el origen INIFAP, es decir hubo mayor contaminación genética en los híbridos producidos por PRONASE, lo cual se esquematiza en la Figura. 3. Esta situación en términos generales, puede deberse a un mejor manejo en los lotes de incremento de líneas y producción de híbridos del origen INIFAP.

Lo anterior sugiere que el mantenimiento de la pureza genética es una actividad sumamente delicada en cultivos halogamos como resulta el caso del maíz. Por otro lado, al observar la Figura 3, también se aprecia un nivel de contaminación diferencial entre híbridos de un mismo origen y resultando menos contaminado el H-135 en ambos orígenes. Este aspecto concuerda con lo indicado por Poey (1991), respecto a que el grado de impureza genética no controlado, se multiplicará en forma exponencial en cada generación de multiplicación. Lo cual está relacionado con las condiciones del presente caso, pues mientras el H-28 fue liberado en 1961, y el H-30 en 1973; el H-135 se liberó en 1987 (Espinosa y Carballo, 1987).

Al relacionar los resultados anteriores con los obtenidos en campo (Cuadro. 7), se aprecia que el origen INIFAP posee diferente calidad genética en relación a los caracteres estrechamente vinculados al rendimiento en grano y en general

para la mayoría de caracteres morfofisiológicos; esto sucede específicamente para los genotipos H-28 y H-30. También es notorio que a pesar que el H-135 de PRONASE tuvo mayor contaminación genética, también fué el que mejor comportamiento agronómico obtuvo frente al similar de INIFAP. Esto sugiere que los alelos "extraños" pueden asociarse con diferencias en rendimiento, pero no es posible indicar si lo hace en forma positiva o negativa. Un elemento que quizá halla favorecido a PRONASE es su mayor peso y tamaño de semilla.

En forma adicional, al tratar de establecer un modelo relacional entre los componentes de la calidad de la semilla, que nos muestre como actúa uno con respecto a otro; se advierte, con base a las determinaciones hechas en el presente estudio, que la mayor pureza varietal (calidad genética), generalmente imprime mayor calidad fisiológica y a su vez mayor rendimiento de grano; y que la calidad física es un elemento secundario, que puede o no estar relacionado a la calidad fisiológica y genética de una semilla.

## 5.2 Calidad de semilla en los orígenes pareados de cada genotipo.

VS-22.

La buena calidad física que tiene el origen PRONASE, expresado básicamente por el peso de semilla (Cuadro. 5) no es

congruente con los parámetros de calidad fisiológica, en donde estos últimos ubican al origen INIFAP en mejor posición de calidad, ya que por ejemplo para velocidad de emergencia (VE), INIFAP esta 116.3 % por arriba de PRONASE, también en el peso seco de la parte aérea (PSPA), INIFAP sobrepasa a PRONASE con un 55.6. A pesar de tal situación que confiere mayor calidad fisiológica al origen INIFAP dentro de las pruebas de invernadero, resulta que dentro del experimento conducido en campo, es PRONASE quien muestra una mejor expresión fisiológica al conseguir un 10 % de mayor rendimiento en grano, que quizá deba de ser la cualidad agronomica más importante; así mismo existe un mayor peso en 200 granos (9 %) en el origen PRONASE lo cual resulta estadísticamente significativo. Además existen otras expresiones con diferencias significativas en los componentes de rendimiento que infieren mayor capacidad de producción a PRONASE: HPM (\*\*), GPH (\*\*) y DIO (\*\*).

A pesar de que las variables restantes no muestran significancia estadística entre orígenes, es interesante observar que en general presenta una mejor expresión de su calidad fisiológica el origen PRONASE, condición que se presenta en parámetros bastante correlacionados con el rendimiento de grano (Tanaka y Yamaguchi, 1977). Al relacionar los resultados de ambos ambientes de ambas evaluaciones es posible mencionar que el comportamiento de una semilla en pruebas de vigor dentro un invernadero no necesariamente reflejará su comportamiento en campo, este aspecto a sido sugerido por Tekrony y Egli (1991), a

tal grado de recomendar ambas pruebas (de campo e invernadero) para poder acreditar rasgos de calidad fisiológica en una semilla

Este comportamiento , en términos generales favorable para el origen PRONASE puede ser debido a un mayor peso unitario de la semilla (Cuadro. 5) que indica una mayor cantidad de fotoasimilados, y tal condición no favorece al origen INIFAP dentro del experimento conducido en campo . Por otro lado el PEVO de la semilla de la VS-22 INIFAP que resulta ser mayor (cuadro. 2) también contiene mayor proporción de semilla chica, esto es un índice de la posible deficiencia en humedad que prevaleció cuando se multiplicó tal semilla, que quizá ocasionara una mejor concentración de proteínas pero no de carbohidratos de aquella semilla que se produjo en la zona con buena humedad . Segun Garay (1983) tales diferencias en tamaño a su vez reflejan diferencias en vigor de las plántulas y diferencias en capacidad de rendimiento.

H-28.

De acuerdo al pareamiento de orígenes realizado en invernadero este genotipo presenta diferencias estadísticamente significativas en PSC (\*\*)y en VE (\*); en tales variables se ve favorecido el origen INIFAP , en PIS INIFAP supera con 9.7 % a PRONASE (cuadro A.6) , en VE lo hace con 19.5 y en PSC con 12 % . Es importante señalar que no obstante a que no existen otras variables con diferencias significativas , las restantes dan a

INIFAP mejor expresión fisiológica , como es el caso de GER , PSPA , MS/PL y PST .

Lo anterior coincide con características importantes evaluadas en campo : REN (7.3 % más en el origen) , AFO (18.8 % a favor de INIFAP) , LMA (11.0 % de mejor expresión en INIFAP) y HPM (12.5 % favoreciendo a INIFAP) , y que desde luego están correlacionadas con el rendimiento (Tanaka y Yamaguchi, 1977). En el experimento de campo también se observa una mejor expresión de características fenotípicas indicadoras de la calidad fisiológica ( no obstante , carecen de significancia estadística) en el origen INIFAP .

Por otro lado y conforme al Cuadro. 2 se observa que los materiales genéticos difieren tanto en año como en lugar de producción, quizá esta situación y un manejo posiblemente diferente provoquen la diferencial, en particular del rendimiento en grano, y en general del comportamiento fenotípico a favor del H-28 de INIFAP, pues las condiciones climáticas pueden variar de un ciclo a otro , esto anivel de campo; además Garay (1983), agrega que el efecto del manejo de la planta madre puede imprimir sesgos en el comportamiento de la calidad fisiológica de un mismo genotipo producido en lugares diferentes . Por otro lado Moreno (1984) indica que el no conservar las semillas en condiciones apropiadas de temperatura y humedad durante su almacenaje provoca decrementos en la calidad de la misma .

Aunado a lo anterior , el análisis de pureza varietal y diversidad genética efectuado en el presente estudio , revela una mayor proporción de alelos "extraños" en el H-28 de PRONASE que en el origen INIFAP. Por tal motivo el Cuadro. 8 indica para la correlación de estos dos tratamientos un valor de distanciamiento genético de 36 veces en 100 y en la Figura. 1 se esquematiza tal situación. Al respecto es pertinente considerar que efectivamente el origen PRONASE presenta tres veces más contaminación que su contraparte , pero de acuerdo al origen poligénico de los rasgos cuantitativos del maíz (Jugenheimer, 1978), no es posible aseverar, que tanto afectan en el diferencial de la expresión fenotípica (entre ella el rendimiento de grano) entre ambos orígenes ; sin embargo retomando en forma general un mejor desempeño del H-28 de INIFAP frente a su contraparte de PRONASE , podemos entonces inferir que posiblemente una mayor presencia de alelos "extraños" en el origen PRONASE produce menor expresión en las componentes del rendimiento de este híbrido, y en particular del rendimiento en grano.

H-30.

El Cuadro. 6, señala diferencias significativas en VE y GER y altamente significativas en PSR y PSRS. Según el Cuadro. 5 PRONASE rebasa a INIFAP con 12.2 %, sin embargo no es consistente con las variables más ligadas a la calidad fisiológica en invernadero, ya que INIFAP posee mayor velocidad de emergencia (72 %), germinación (15.0) y peso en sus raíces (39.2 %), esto

concuerta con un mejor rendimiento de grano en campo, así como con algunas otras características de mejor expresión fisiológica ligadas al rendimiento y que poseen diferencias significativas. El Cuadro. 7 muestra que este pareamiento de tratamientos posee la mayor disparidad en el rendimiento de grano (22.5 %) a favor de INIFAP , esto resulta congruente con algunos reportes señalados con anterioridad de mermas en el rendimiento de grano del H-30 de PRONASE de hasta un 30 % respecto a INIFAP (INIFAP, 1989).

Por otro lado resulta contrastante el hecho de que a pesar de tener un mayor peso la semilla de PRONASE (12.2 %) se comporte con un 22.5 % de menor rendimiento en grano, pues algunos trabajos recientes (Santiago , 1988 ; Morales , 1989) muestran la alta relación del tamaño de la semilla con caracteres deseables en campo por lo menos hasta estado de plántula, así mismo existen otros trabajos como los de Tekrony y Egli, (1991) en los que se asegura que tanto el tamaño de la semilla como el peso específico de la misma, no siempre resultan con buena correlación hacia altos rendimientos de grano en campo, indicando con lo mencionado y lo obtenido en este estudio, que la buena calidad genética en una semilla puede producir buenas expresiones fenotípicas (entre ellas el rendimiento) de caracteres agronomicamente deseables sin importar el tamaño de la misma. Una condición importante en el bajo rendimiento del H-30 de PRONASE es quizá su año de origen, el cual es tres veces anterior al del origen INIFAP (Cuadro. 2), lo cual puede explicar una



disminución de su calidad fisiológica , siendo en parte a la variación climática a través de los ciclos de incremento (Tekrony , 1980), al manejo propiamente de la planta madre (Garay, 1983) o posiblemente a las condiciones de almacenaje (Moreno, 1984).

Todo lo anterior parece indicar que el H-30 de INIFAP posee una mayor calidad, ya que los resultados anteriores coinciden con el análisis genético de laboratorio, el cual demostró que este origen presenta mayor pureza varietal (sólo posee contaminación en tres locus) que su contraparte de PRONASE (presenta contaminación en 10 locus); por ello la matriz de distancias genéticas presenta 30 % de separación entre ambos orígenes respecto a las líneas progenitoras de INIFAP. Así mismo es en PRONASE donde se presenta la mayor proporción de plantas contaminadas de la muestra elegida (Cuadro. 9).

#### H-129.

Los datos de invernadero sólo muestran diferencia significativa en PSR y a favor de INIFAP, lo cual es una muestra del mejor desempeño durante la prueba para tal origen. Otras variables ligadas con el vigor no resultaron con diferencia significancia estadística, sin embargo dan a INIFAP una mejor posición dentro de la calidad fisiológica: 20.5 % de mayor germinación, 20 % de más peso en la parte aérea, y 22.6 % de mayor contenido en MS/PL. Esta situación vuelve a ser consistente con los resultados favorables en campo (Cuadros.7) del origen

INIFAP, ya que resulta significativo un mayor REN (9.5 %) a favor de este origen, también se aprecia diferencia significativa en PEVO y GPH, que desde luego están bien relacionadas con el rendimiento en grano.

Para este pareamiento no se tienen datos de análisis genético de laboratorio, sin embargo se puede atribuir el diferencial a favor de INIFAP en este genotipo a la pérdida de calidad fisiológica a través del tiempo, ya que el Cuadro. 2 indica cuatro años de diferencia entre orígenes.

H-135.

Según los datos generados en invernadero (Cuadro. 6) el origen PRONASE presentó buen comportamiento de caracteres ligados a la acumulación de materia seca, que para efecto de pruebas de vigor es apropiado, tal es el caso de mejor expresión en P5PA (56.5 %), PSR (5.7 %), MS/PL (36.4 %); también presentó mayor tamaño y peso de semilla (Cuadro. 3), resultando para invernadero muy favorable, no obstante a que también este origen es quien presenta mayor PSRS, sin embargo la cantidad de nutrimentos es bien utilizado en el H-135 de PRONASE en base al IEF (24 %) y respecto al origen INIFAP.

Además en la evaluación de campo este pareamiento confirmó mejor rendimiento de grano al H-135 de PRONASE (6.0% sobre de INIFAP) lo cual resulta estadísticamente significativo. Al

parecer en esta muestra pareada no influye el año de producción, pues ambos orígenes datan del mismo y sólo difieren en cuanto al lugar de producción (Cuadro. 2). Por ello este último aspecto parece influir positivamente en el comportamiento de la calidad fisiológica del origen PRONASE, ya que el Cuadro. 5 muestra que el peso de mil semillas de INIFAP es mucho menor (71.3 %) que la semilla de PRONASE y que de acuerdo al peso volumétrico es fácil considerar su menor tamaño, lo cual es congruente con las proporciones en la composición de los diferentes tamaños de semilla de las muestras primarias (Cuadro. 5). Por lo anterior es posible inferir que para el presente caso el tamaño de la semilla fue un factor importante en el rendimiento de grano. Respecto al DIM y LMA, resultan de un mejor comportamiento en la etapa de elongación radial y longitudinal del jilote, previa a la fase de llenado de grano (Tanaka y Yamaguchi, 1977), y desde luego refleja una buena calidad fisiológica de la semilla resultando además con buena expresión en las otras características fenotípicas que no obstante a no presentar diferencias significativas si poseen una mejor expresión frente a las correspondientes de INIFAP.

En forma adicional este par de tratamientos también fue objeto de análisis genético, y los resultados de este indican que ambos orígenes son los materiales menos contaminados de entre el grupo analizado por PLFR's en laboratorio. La explicación de tal situación posiblemente se debe al menor tiempo de manejo en sus incrementos, ya que este híbrido fue liberado comercialmente en

1987 (Espinosa y Carballo, 1987) lo que a la fecha de evaluación representa dos años de manejo en el caso de los materiales utilizados en el presente estudio, que comparados con los años de manejo que poseen los demás híbridos participes del experimento en laboratorio (H-28 liberado en 1961 y H-30 en 1973) resulta relativamente reciente su aparición en el escenario agrícola nacional. además otro factor de su baja contaminación puede ser su mayor facilidad para obtenerlo (por ser un híbrido trilineal).

#### H-311.

Los datos obtenidos en invernadero confieren al H-311 de INIFAP mejor comportamiento en caracteres ligados con vigor fisiológico como es el caso de mayor VE (23.7 %) y GER (17.5 %) en donde el primero resultó con diferencia significativa. Al parecer el mayor peso de semillas en PRONASE (16.3 %) produjo mejor expresión en características ligadas con la acumulación de materia seca, no obstante a que ninguna de ellas resulta con diferencias significativas. Respecto al comportamiento en campo sólo en P200 y LMA se aprecian diferencias significativas, siendo estas a favor de PRONASE y que están bien relacionadas con el rendimiento de grano. Las restantes variables no presentan significancia estadística y las diferencias entre orígenes son mínimas aún en las variables más interesantes, como: REN (4 % a favor de INIFAP), DIM (4.1 % a favor de PRONASE), CGM (1.7 % favoreciendo a PRONASE), PEVO (8.0 % a favor de INIFAP), HPM (6.7 a favor de INIFAP) entre otras. Tal situación está de acuerdo

con la producción de ambos orígenes en el mismo año es decir que este aspecto no influye sobre la calidad fisiológica en ambos orígenes y considerando que los dos materiales genéticos son sembrados en áreas recomendadas para su incremento de semillas, es posible inferir que las presentes diferencias de estos orígenes pareados se deba al error experimental.

H-313.

De acuerdo al Cuadro. 6 se puede apreciar que en invernadero el HV-313 de INIFAP resulto con mejor expresión fisiológica, ya que tuvo mayor VE (52.7 %) más peso seco de la parte aérea (25.9 %) y mayor MS/PL (24.4 %); todas ellas con significancia estadística (las primeras al 1 % y las segundas al 5 % de probabilidad). Estos resultados se manifiestan muy relacionados con caracteres evaluados en campo y que están ampliamente relacionados con el rendimiento en grano: AFO (10.4 % a favor de INIFAP), P200 (7.2 % por arriba de PRONASE), PEVO (1.7 % a favor de INIFAP), LMA (7.0 de mayor longitud en INIFAP) y desde luego el mismo REN (14.8 % favoreciendo a INIFAP), todas las anteriores con significancia estadística; otra componente del rendimiento con diferencia significativa, pero que favorece a PRONASE es la MSE (aunque sólo lo hace con 2 % por arriba de INIFAP), sin embargo este origen también presenta mayor proporción de mazorcas podridas (7.0 %)

Todo lo anterior sugiere ubicar al HV-313 de INIFAP con mayor contenido de calidad, quizá como consecuencia de un mejor manejo de la planta madre, así como durante las actividades de cosecha, secado y almacenado. Además es posible que el año de diferencia que se tiene entre ambos orígenes induzca un mejor desempeño en el híbrido varietal de origen INIFAP.

Por todos los comentarios vertidos hasta ahora es posible considerar que los diferentes comportamientos en general de los fenotipos y en particular de los orígenes de producción de un mismo genotipo, obedecen a un cuadro de poblaciones segregantes, lo cual es atribuible al bajo nivel de endogamia en las líneas progenitoras. Así mismo, los factores de lugar y año de producción, anexo a los diferentes manejos a que son sometidos los materiales genéticos durante el proceso de producción de los mismos interactúan de tal forma que inducen comportamientos mucho muy particulares hacia el interior de cada origen y de cada genotipo.

Respecto al análisis genético de pureza varietal, es posible agregar que la técnica de los PLFR's es eficaz en mostrar el grado y la localización de las diferencias de los genotipos, de acuerdo en este caso, a su origen de producción. Prueba de lo mencionado es que a pesar de no haber utilizado en este estudio a las líneas progenitoras de los híbridos producidos por PRONASE, el diagnóstico de la pureza varietal es válida, ya que demuestra que los genotipos presentan diferencias en la presencia de alelos

de acuerdo a su origen de producción e independientemente del análisis de sus líneas progenitoras . Así pues el nivel de polimorfismo indicado en este análisis en base a las combinaciones citadas de sonda/enzima (Cuadro. 4), que éste existió en por lo menos un híbrido, proporcionando un promedio general de alelos detectados de 4.2 en los dos orígenes de producción en cada uno de los tres híbridos donde fué posible su análisis por PLFR's.

Así mismo, estos resultados de polimorfismo son congruentes con los obtenidos también en maíz por Godshalk et al. (1990), Melchinger et al. (1991) y Lee et al. (1990), y el doble de los encontrados en estudios donde se han utilizado marcadores de isoenzimas según lo reportado por Goodman y Stubert (1983), y Smitch et al. (1985 a , 1985 b).

Por otro lado, en cuanto a la diversidad genética encontrada, los resultados coinciden plenamente con los datos de pedigree (Cuadro. 3), ya que de los subgrupos formados (Figura. 1) el primero de ellos se conforma con los orígenes del H-28 y del H-30, los cuales tienen progenitores en común de la colecta Michoacan-21.

Considerando las diferentes condiciones experimentales, las características del material genético y los análisis efectuados para cada parte del presente estudio, exponemos las siguientes:

## VI CONCLUSIONES.

1.- Todos los híbridos y variedades mejoradas correspondientes a un mismo genotipo y producidas en diferente lugar y año de producción mostraron diferencias en rasgos de calidad física, genética y fisiológica.

2.- Las pruebas de pureza varietal en campo (grow-out), señalaron diferencias estadísticas entre orígenes para los genotipos VS-22, H-28, H-129, H-135 y HV-313; así como semejantes para el H-311.

3.- Los híbridos H-30, H-28 y H-135, analizados por la técnica de marcadores genéticos PLFR's, presentaron alelos no portados en las líneas progenitoras utilizadas, manifestándose en mayor grado en los genotipos producidos por PRONASE, y de estos, el H-30 presentó mayor divergencia entre orígenes, ocurriendo lo contrario con el H-135.

4.- El origen de producción que obtuvo en general mayor calidad física fué PRONASE.

5.- Los genotipos de origen INIFAP presentaron en términos generales mayor calidad fisiológica.

6.- El mayor contenido de calidad genética (pureza varietal) estuvo representado por los genotipos de origen INIFAP.



7.- El mayor peso de la semilla en la VS-22 de PRONASE le confirió buena calidad física, siendo consistente con un mejor rendimiento en campo, pero no así con caracteres relacionados con la calidad fisiológica en invernadero.

8.- El H-28 de INIFAP fué consistente en la mejor expresión de sus tres cualidades de excelencia: física, genética y fisiológica frente a su contraparte de origen PRONASE.

9.- La mejor calidad física expresada por un mayor tamaño y peso de la semilla en el H-30 de PRONASE, no proporcionó mejor desempeño fisiológico tanto en invernadero como en campo.

10.- El H-129 de INIFAP se manifestó con mejores tendencias de calidad fisiológica, lo cual fué evidente tanto en pruebas de invernadero como de campo, a pesar de tener menor calidad física por concepto del peso de la semilla.

11.- El H-135 de PRONASE tuvo mejor desempeño de calidad tanto física como fisiológica, contando con mayor contaminación genética respecto al origen INIFAP.

12.- Entre los orígenes del H-311 no existieron diferencias de calidad física ni fisiológica, mostrando un comportamiento similar tanto en invernadero como en campo.

13.- El origen INIFAP del HV-313 se mostró en general con mayor calidad fisiológica y física respecto a su contraparte de origen PRONASE.

14.- Las pruebas de calidad deben hacerse año con año y combinando las diferentes técnicas a fin de evaluar todos los componentes que participan en la calidad de un lote de semillas.

15.- Las pruebas de verificación genética en campo (grow-out) y laboratorio (PLFR's), pueden complementarse satisfactoriamente para emitir dictámenes minuciosos de la calidad en los lotes de semillas.

## V I I BIBLIOGRAFIA.

- Alvares L., E. 1980. Las semillas y las ciencias agronómicas, en: Primer seminario sobre semillas mejoradas en México, D. F. pp. 1-11.
- Arus, P. 1983. Genetic purity commercial seed lots, in: Isozymes in: plant genetics and breeding, part A. S. D. Tanksley and T. J. Orton (Ed) Elsevier, Science Publisher B. V. Amsterdam. pp. 415-423.
- Austin R., B. 1972. Effects of environment before harvesting on viability, in: E. H. Roberts (Ed). Viability of seeds. Syracuse University. Press. Syracuse, New York. pp. 115-143.
- Bailey, Douglas C. 1983. Isozymic variation and plant breeders' rights, in: plant genetics and breeding, part A. S. D. Tanksley and T. J. Orton (Ed) Elsevier, Science Publisher B. V. Amsterdam. pp. 425-440.
- Barkin, D. y B. Suárez. 1983. El fin del principio, las semillas y la seguridad alimentaria. Centro de Ecodesarrollo. México, D. F.
- Barrera G., F. C. 1986. Evaluación de la calidad de semillas, en: Curso de actualización en tecnología de semillas. Asociación Mexicana de Semilleros A. C. UAAAN pp. 39-58.
- Bean, E. W. 1980. Factors affecting the quality of herbage seeds, in: P. D. Hebblethwaite (Ed). Seed Production Great Britain. Butterworths. pp. 593-604.
- Becerril, C. 1987. Técnicas para muestreo y pureza física en: Curso de actualización en tecnología de semillas. Asociación Mexicana de Semilleros A. C. UAAAN pp. 117-128.
- Bekendam, J. 1975. Germination. Seed Sci and Technology. 3 (2): 517-521.
- Bustamante, L. 1982. Semillas. Control y evaluación de su calidad. en: Memorias del curso de actualización sobre tecnología de semillas. UAAAN. Asociación Mexicana de Semilleros A. C. pp. 99-106.
- Bustamante, L y Orozco, J. 1986. Conceptos básicos para la evaluación de la calidad en las semillas, en Curso de actualización en tecnología de semillas. UAAAN. Asociación Mexicana de Semilleros A. C. pp. 34-46.
- Brauer H., O. 1973. Fitogenética aplicada. Limusa (Ed). México D. F. pp. 421-440.

- Cadwell, P. W. 1962. Seed quality and control. Procc. Seedsmens Short Course. Mississippi Seed Technology Laboratory. State College Mississippi. pp 151-154 .
- CAEVAMEX. 1986. Híbridos obtenidos por el INIA y sus antecesores hasta 1985. Mecanografiado. Chapingo, México.
- Carver, M. 1980. The production of quality cereal seed, in: P. D. Hebblethwaite (Ed). Seed Production. Great Britain, Butt. pp 295-305.
- Cervantes G., F. J. 1990. Efecto de la inoculación, fertilización foliar y edáfica sobre la calidad y productividad de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). UNAN. FES-C. México. 70 p.
- C. I. A. T. 1983. Metodologías para obtener semillas de calidad. Cali, Colombia.
- C.I.A.T. 1991. Curso: Control de calidad en el campo beneficio y almacenamiento de semillas. Mecanografiado Cali, Colombia. 222 p.
- Cisneros, J. 1986. Factores que afectan a la calidad de la semilla en el campo, en: Curso de actualización en tecnología de semillas. pp. 65-72.
- Espinosa C., A. y Carballo C., A. 1987. H-135 Nuevo maíz híbrido de riego para la zona de transición el bajo Valles Altos. SARH-INIFAP. Folleto tecnico No. 1 Chapingo, Méx.
- Evans, L.T., and Wardlaw, L. F. 1984. Comparative physiology of grain yield in cereales. División of plant industry, CSIRD, Camberra, ACT, Australia. Advances in Agronomy. 28: 301-350.
- FAO. 1978. Semillas agrícolas y hortícolas. FAO (Ed) Barcelona, España. pp 387-394.
- Font Quer, P. 1977. Diccionario de Botánica. Labor (Ed) Barcelona España. pp 1248.
- Frediani, M., Mezzanotte, R., Vanni, R., Pignone, D. and Cremanini, R. 1987. The biochemical and cytological characterization of *Vicia faba* DNA by means of MboI, AluI, AluI and Bam HI restriction endonucleases. Theor. Appl. 75: 46-50.
- Garay A. E. 1983. Calidad de la semilla y su importancia en la productividad. Apuntes mimeografiados, VII curso en tecnología de semillas, CIAT, Cali, Colombia.
- García A. Enriqueta. 1973. Modificaciones al sistema climático de Koppen. UNAM. Méx., D.F. pp. 39 .

- García G., J.C.1981. Control de calidad de semillas en postcosecha. Conferencia en el primer curso avanzado en protección y control de calidad de semillas. Cali, Colombia.
- Garduño V., J. L. 1985. Curso de producción y tecnología de semillas. FES-Cuautitlan, Méx. p. 3.
- Gelmond, H. 1978. Physiological aspects of seed germination. Seed Sci. and Technology. 12 (2): 561-575.
- Godshalk, E. B., M. Lee and K. R. Lamkey.1990. analysis of the maize single-cross hybrid performance.Theor. Appl.Genet. 80: 273-280.
- Guillen A., H. 1991. Huellas genéticas de maíces híbridos en México: Aplicación de la técnica RFLP's. Ultimas noticias, CIMMYT, Batan, México.
- Guillen A., H. 1992. Informe final de proyecto de investigación del programa de marcadores genéticos moleculares. SARH-INIFAP-CEVAMEX. Chapingo,México. 17 p.
- Hall, R. D. and Wiesner, L. E. 1990. Relationship between seed vigor test and field performance of "Regar" meadow bromegrass. Crop Sci 30: 967-970.
- Hartman H., T. y E. Kester, D. 1980. Propagación de plantas; principios y prácticas. Continental (Ed). México D. F. 810 p
- Hernández L., A. 1985. Efecto de la fertilización y densidad de población en el rendimiento y calidad de semilla de girasol . Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México .
- Hess, D. 1980. Fisilología vegetal. Omega (Ed). Barcelona, España pp. 304-309.
- Hoisington, D. 1992 . Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. México, D. F. : CIMMYT.
- Hunter, C. 1971. Seed quality and crop performance. Handbook of seed technology. Mississippi State University.
- I.N.I.F.A.P. 1989. Programa Nacional de Producción de Maíz en México. INIFAP PRONAMAT OPERATIVO 1990 - 1994.
- Iraistorza M., H. 1991. Pruebas de vigor, pruebas de frío para maíz, en: Curso de control de calidad en el campo beneficio y almacenamiento de semillas. Cali, Colombia. pp. 167-170.
- Jugenheimer, R.W. 1981. Maíz variedades mejoradas,métodos de cultivo y producción de semillas. Limusa (ed) pp. 75-79.

- Kochert, G. 1990. Introduction to RFLP mapping and plant breeding applications. Department of botany University of Georgia. The Rockefeller Foundation International Program on Rice Biotechnology.
- Lee, M. Godshalk, E. B. Lamkey, R., Woodman, W. W. 1989. Association of restriction fragment length polymorphisms among inbreds with agronomy performance of their crosses. *Crop Sci.* 29: 1067-1071.
- Lee, E. A., Lee, M., Lamkey, K.R. 1990. Molecular marker analysis off Iowa stiff stalk syntetic (*Zea mays* L.) inbred lines. *Theor. Appl. Genet.*
- Márquez S., F. 1985. Genotécnia vegetal. AGT (Ed). Vol I . México , D. F.
- Melchinger, A. E., Lee, M., Lamkey, K.R. Hallaver A.R. Hallaver and Woodman, W. L. 1990. Genetic diversity for restrictio fragment length polymorphisms and heterosis for two diallel sets of maize inbreds. *Theor Appl. Genet.* 80: 448-496.
- Melchinger, A. E., M.M. Meassmer, M. Lee W.L. Woodman, K. R. Lamkey. 1991. Diversity and relationships among US maize inbreds revealed by restriction fragment length polymorphisms. *Crop Sc.* 31:669-678.
- Milton P. J. 1963. Mejoramiento genético de las cosechas Limusa (Ed). México D. F. pp. 71-95, 263-298.
- Morales R., F. 1989. Efectos del tamaño de semilla y vigor de la plántula sobre caracteres agronómicos y rendimiento en maíz. Tesis profesional FES- Cuautitlan, UNAM. México.
- Moreno R., E. 1976. Manual para el análisis de semillas. SAG. México, D. F.
- Moreno R., E. 1984. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología. UNAM México 383 p.
- Orozco, J. 1986. Evaluación de la pureza varietal en campo, en: Curso de actualización en tecnología de semillas. UAAAN. Asociación Nacional de Semilleros pp: 56-63.
- Perry D., A. 1980. El concepto de vigor de la semilla y su relevancia en las técnicas de producción de semilla, en: P. D. Hebblethwaite, P. D. (Ed): Producción moderna de semillas. Londres, Inglaterra Butterworth.
- Perry D., A. 1981. Handbook of vigour test method. ISTA. Zurich, Switzerland. 72 p.

- Pidi H., S. 1981. La germinación en las semillas, en curso sobre el manejo en el almacenamiento de granos y semillas. CONASUPO. México D. F.
- Poey, F. 1991. Mantenimiento de la pureza genética en materiales parentales, en: Curso sobre el control de la calidad en el campo, beneficio y almacenamiento de semillas. CIAT, Cali. Colombia.
- Ramírez C. J. A. 1991. Época de cosecha del maíz de cruza simple H-34, calidad de su semilla y capacidad de rendimiento. Tesis profesional FES-Cuautitlan. UNAM, México 119 p.
- Reyes C., P. 1990. El maíz y su cultivo, AGT (Ed.) pp. 157-162.
- Riedel, G. E., Swanberg, S. L., Kuranda, K. D. Marquette, K., La Pani, P., Bledsoe, P. Kennedy, A. and Lin, B. Y. 1990. Denaturing gradient gel electrophoresis identifies genomic DNA polymorphisms with High frequency in maize. *Theo. Appl. Genet.* 80: 1-10.
- Rodríguez V., I. E. 1988. El sistema de producción y certificación de semillas, en: Manual de producción y manejo de semillas. Patronato para la investigación fomento y sanidad vegetal, Tamaulipas, Méex.
- Rogers, J.S. 1972. IV Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in Genetic.* VII. Univ. Texas Publ. 7213: 145-153.
- Saghai-Maroo, M.A., K.M. Soliman, R. A. Jorgensen, R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in Barley: Mendelian inheritance chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.: USA*, 81: 8014-8018.
- Santiago R. L. H. 1988. Comportamiento de germinación y vigor en semillas de maíz de distinto origen genético sometidas a diferentes temperaturas sustratos. Tesis profesional. FES-Cuautitlan. UNAM. México. 84 p.
- Sayers, R. 1982. Pruebas de germinación y vigor, en: Memorias del curso de actualización sobre tecnología de semillas. UAAAN. Asociación Mexicana de Semilleros A. C. pp: 129-136.
- Smith, J.S.C., M.M. Goodman and C.W. Stbert. 1985a. Genetic variability within U.S. maize germoplasm: I. Historically important lines. *Crop Sci.* 25:550-555.
- Smith, J.S.C., M.M. Goodman and C.W. Stbert. 1985b. Genetic variability within U.S. maize germoplasm: II Widely used inbred lines 1970-1979. *Crop Sci.* 25:681-685.

- Smith, J. S. C. and Smith, O. S. 1988. Associations among inbred lines of maize using electroforetic, chromatographic, and pedigree data. *Theor Appl Genetic*. 76: 46-50.
- Stubert, C. W. and Goodman, M.M., C.W. 1983. Races of maize. VI. Isozyme variation among race of maize in Bolivia. *Maydica XXVIII*: 169-187.
- S. A.R. H. 1983. Ley Sobre Producción, Certificación y Comercio de Semillas de los Estados Unidos Mexicanos. Folleto PRONASE, México, D. F.
- Steel, R. G. D. y Torrie, J. H. 1988. Bioestadística, principios y procedimientos. Mc Graw-Hill (Ed). México D.F. pp. 83-117.
- Tanaka, A. y Yamaguchi, J. 1977. Producción de materia seca, componentes del rendimiento y rendimiento del grano en maíz. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Méx. pp. 11-18, 20-30, 35-55.
- Tanksley, S. D. and Orton, T. J. 1983. Isozymes in plant genetics and breeding. part A. Elsevier, New York, USA. pp. 85-111.
- Tekrony, D. M. 1980. Efecto del ambiente de producción sobre la calidad de la semilla de soya, en: Heblethwaite. Londres, Inglaterra. pp: 483-510.
- Tekrony, D. M. and Egli, D. B. 1991. Relationship of seed vigor to crop yield: A review. *Crop Sci* 31: 816-822.
- Thompson, J. R. 1979. Introducción a la tecnología de semillas. Acribia (Ed), Zaragoza, España. pp 1-44.
- Tijerina M., A. 1980. Producción de semillas mejoradas, en: Primer seminario sobre semillas mejoradas. Ecodesarrollo. México, D. F. pp: 20-28.
- U.S.D.A. 1988. Techniques and scoring procedures for starch gel electroforesis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). North Carolina Agricutural Research Service, North Carolina State University, Raleigh North Carolina. Technical Bulletin 286, 37 p.
- Vaquero, F., Rebordinos, L, Vences, F. J. and Pérez de la Vega, M. Genetic mapping of isozyme loci in *Secale cereale* L. *Theor Appl Gent*. 76: 39-44.
- Vaughan, A. P. 1970. Beneficio y acondicionamiento en semillas de calidad. Acribia (Ed). Zaragoza, España pp: 13-21 .



## VIII APENDICE.

Cuadro. 1A Componentes de reacción para la digestión de restricción de ADN genómico.

SOLUCION	CONCENTRACION FINAL	300 ul RIN
Buffer 10X	1 l	30 ul
Espermidina 0.1M	2.5 mM	7.5 ul
Agua destilada		119.2 ul
Enzima	2.5/ug ADN	10 ul
ADN 0.3 ug/ul		133.3 ul

Cuadro. 2A Componentes de reacción para la amplificación del inserto mediante tecnología PCR .

SOLUCION	CONCENTRACION FINAL	25 ul RIN
Agua destilada		11.9 ul
Buffer PCR 10X	1l	2.5
dNTP 10mM c/uno	50 uM c/uno	0.510.125 c/uno)
Enzima Taq 5U/ul	0.5 U	0.1
Primer CV 72.2mM	0.2 mM	2.5
Primer CV 76.2mM	0.2 mM	2.5
Plásmido.10 ng/ul	50 ng	5.0

† secuencia de los primers

CV 72 5' - ACGACGTTGTAAACGACGCGCCAGT-3'

CV 76 5' -AAGCAGCTATGCCATGAAATTACCC-3'

Cuadro. 3A

Relación de componentes de reacción para la incorporación de Digoxigenin-dUTP .

SOLUCION	CONCENTRACION FINAL	100 ul RN
Agua destilada		57.6 ul
buffer PCP,10X	1X	10.0
dITP-dNTP, 10mM	50 mM	1.5
dTTI . 10 mM	48.75 uM	0.4875
dUTP . 1 mM	1.25	0.125
Enzima taq,5U/ul	0.5 U	0.4
Primer CV 72,2mM	0.2 mM	10.0
Primer CV 76,2mM	0.2 mM	10.0
Plasmido,10 ng/ul	100 ng	10.0

Cuadro. 4A

Composicion de buffers utilizados en la hibridacion y marcaje de sondas.

## BUFFER 1

STOCK	FINAL	1000 ML	2000 ML	4000 ML
1 M Tris-HCl, pH 7.5	0.01 M	10 ml	20 ml	40 ml
5 M NaCl	0.15 M	30 ml	60 ml	120 ml

## BUFFER 2

STOCK	FINAL	50 ml	100 ml	200 ml
1 M Tris-HCl, pH 9.5	0.01 M	0.5 ml	1 ml	2 ml
5 M NaCl	0.15 M	1.5 ml	3 ml	6 ml
Reactivo Blocking	0.1 %	50 ug.	100 ug.	200 ug.

## BUFFER 3

STOCK	FINAL	100 ml	200 ml	400 ml
1 M Tris-HCl, pH 9.5	0.01 M	1 ml	2 ml	4 ml
5 M NaCl	0.1 M	2 ml	4 ml	8 ml
1 M MgCl 2	0.05 M	5 ml	10 ml	20 ml