



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA

---

---

**“ EVALUACION POR ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS  
DE LA DIVERSIDAD GENETICA DE LOS HIBRIDOS DOBLES  
DE MAIZ H-28 Y H-30 ”**

BO1207/96  
Ej. 2

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL TITULO DE

**BIOLOGO**

P R E S E N T A

**VICTOR MONTERO TAVERA**

ENEPI

TLALNEPANTLA, MEX. MARZO DE 1996



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

ESTA TESIS FUE REALIZADA BAJO LA DIRECCION DE LA DOCTORA HILDA SUSANA AZPIROZ RIVERO, INVESTIGADORA TITULAR DEL CAMPO AGRICOLA EXPERIMENTAL "VALLE DE MEXICO" CIR-CENTRO DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES Y AGROPECUARIAS Y ENCARGADA DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA; QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE **"BIOLOGO"** FUE REVISADA Y APROBADA POR:

DRA. H. SUSANA AZPIROZ RIVERO  
M.C. SERGIO GONZALEZ MORENO  
M.C. IGNACIO PEÑALOZA CASTRO  
BIOL. ROBERTO VELAZCO GARCIA  
BIOL. CESAR FLORES ORTIZ

TLALNEPANTLA, MEXICO. MARZO DE 1996

“Cuando un hombre empieza a aprender, nunca sabe lo que va a encontrar. Espera recompensas que nunca llegarán. Lo que se aprende no es nunca lo que uno creía. Y así tropieza con el primero de sus enemigos naturales: ¡el miedo! Para superar su miedo el hombre debe desafiarlo y dar el siguiente paso en su aprendizaje y el siguiente y el siguiente; no debe detenerse, entonces empezará a sentirse seguro de sí. Aprender no es ya una tarea aterradora. Cuando lleve ese momento el hombre habrá vencido a su primer enemigo natural. A cambio del miedo ha adquirido la claridad de mente que le permite conocer y satisfacer sus deseos; nada está oculto.

Así ha encontrado a su segundo enemigo: ¡la claridad! Porque dispersa el miedo pero también ciega. Hace al hombre no dudar nunca de sí; tiene valor porque tiene claridad. Pero todo es un error, es como si viera algo claro pero incompleto.

Para derrotar a su segundo enemigo debe desafiar su claridad y usarla sólo para ver, y vendrá un momento en que comprenda que su claridad era sólo un punto en sus ojos. Sabrá entonces que por fin ha alcanzado el poder; puede hacer con él lo que se le antoje.

Entonces el hombre habrá encontrado a su tercer enemigo: ¡el poder! Un hombre en esta etapa apenas advierte que su tercer enemigo se cierne sobre él. Y de pronto, sin saber, habrá perdido la batalla. Su enemigo lo habrá transformado en un hombre cruel y caprichoso.

El hombre tendrá que desafiar a su tercer enemigo con toda intención y darse cuenta de que el poder que aparentemente ha conquistado nunca es suyo en verdad. Entonces sabrá cómo y cuándo usar ese poder. Así habrá vencido a su tercer enemigo.

Pero el hombre estará para entonces al final de su travesía por el camino del conocimiento y, casi sin advertencia tropezará con su último enemigo: ¡la vejez! Este enemigo es el más cruel de todos, el único al que no se puede vencer por completo. Este es el tiempo en que el hombre ya no tiene miedo ni una claridad impaciente, todo su poder está bajo su control; pero también siente un deseo constante de descansar, si se rinde a ese deseo habrá perdido el último asalto y se convertirá en una débil criatura vieja. Pero si el hombre se sacude el cansancio y vive su destino hasta el final, puede entonces ser llamado hombre de conocimiento, aunque sólo sea por esos momentos en que logra ahuyentar al último enemigo, el enemigo invencible. Esos momentos de claridad, poder y conocimiento son suficientes.”

“LAS ENSEÑANZAS DE DON JUAN”

Carlos Castaneda

## DEDICATORIA

### A MIS PADRES:

Por la confianza incondicional que tuvieron para mí. Por haberme dado todo sin esperar nada a cambio. Por el cariño infinito. Por haberme dado la vida...

### A MARISOL:

Por ese amor sin límites que me has dado. Por esa paciencia de santa en los momentos difíciles. Por la mano siempre tendida hacia mí también en los momentos buenos. Por haber perpetuado nuestra sangre y nuestra carne en dos hijos maravillosos. En fin, porque te amo...

### A MIS HIJOS:

Porque son el combustible que me empuja a ser cada vez mejor y a escalar alturas insospechadas. Para engendrar el amor y el orgullo en su corazón.

A MIS HERMANOS:

Por el cariño fraternal nunca extinto a pesar de la distancia.

A CARLOS:

Para que mi ejemplo sólo sirva para ser superado por tí.

A GREGORIO Y FAMILIA PEREZ MONTERO:

Por todos los años de estudio en su casa que llegó a ser mía. Por compartir los momentos cotidianos que construyen a la familia.

**A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE ME AMAN O ME AMARON.**

## AGRADECIMIENTOS

A LA ENEPI:

Por permitirme recorrer en tí los caminos semestrales.

AL CEVAMEX:

Por darme la oportunidad de conocer la ciencia formal.

A LA DRA. SUSANA AZPIROZ:

Por apoyarme y estimularme cuando más lo necesitaba. Por su atinada dirección y sus consejos en la realización de esta tesis.

AL DR. JULIAN BERTHAUD:

Por sus oportunos consejos en el aprendizaje de la técnica que me permitió realizar el presente estudio. Por poner su laboratorio a mi disposición.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

Martín, Gerardo, Elisa, Rosario, Marco Antonio y Ricardo.

Por darme su amistad sólo a cambio de la amistad.

## CONTENIDO

	Página
Lista de Figuras .....	ii
Lista de Figuras del Apéndice A .....	iii
Lista de Cuadros .....	iv
Lista de Cuadros del Apéndice B .....	v
Resumen .....	vi
I. Introducción .....	1
II. Antecedentes .....	6
III. Materiales y Métodos .....	12
3.1. Preparación de la Muestra .....	13
3.2. Preparación del Gel .....	14
3.3. Revelado de las Muestras .....	16
3.4. Análisis Estadístico .....	17
IV. Resultados .....	21
V. Discusión de Resultados .....	32
VI. Conclusiones .....	37
VII. Apéndice A .....	38
VIII. Apéndice B .....	43
IX. Bibliografía .....	52

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Dendograma de Nei para el H-28 y sus progenitores .....	29
2 Dendograma de Nei para el H-30 y sus progenitores .....	30
3 Dendograma de Rogers para el H-28 y sus progenitores .....	30
4 Dendograma de Nei para los Híbridos Dobles .....	31

## LISTA DE FIGURAS DEL APENDICE A

Figura	Página
1 Zimograma representativo de la enzima Alcohol Deshidrogenasa .....	38
2 Zimograma representativo de la Enzima Málica .....	38
3 Zimograma Representativo de la enzima Esterasa .....	39
4 Zimograma representativo de la enzima Fosfatasa Acida .....	39
5 Zimograma representativo de las enzimas Fosfohexosa Isomerasa..... y 6-Fosfogluconato Deshidrogenasa	40
6 Zimograma representativo de la enzima Fosfoglucomutasa .....	40
7 Zimograma representativo de la enzima Malato Deshidrogenasa .....	41
8 Zimograma representativo de la enzima Shikimato Deshidrogenasa...	42
9 Zimograma representativo de la enzima Transaminasa Glutámico..... Oxaloacética.	42

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Genealogía de los Híbridos Dobles h-28 y H-30 .....	12
2 Genealogía de las líneas progenitoras de los híbridos H-28 y H-30	13
3 Sistemas enzimáticos revelados .....	16
4 Isoenzimas, Número de Loci y Localización Cromosómica .....	21
5 Frecuencias Alélicas por Locus y Genotipo .....	22
6 Número y Riqueza de Alelos, Porcentaje de Loci Polimórficos y Heterocigosidad.	25
7 Distancias Genéticas de Rogers entre el H-28 y sus progenitores	26
8 Distancias Genéticas de Nei entre el H-28 y sus progenitores ....	26
9 Distancias Genéticas de Rogers entre el H-30 y sus progenitores	27
10 Distancias Genéticas de Nei entre el H-30 y sus progenitores ....	27

## LISTA DE CUADROS DEL APENDICE B

Cuadro	Página
8.1 Buffer de Extracción .....	43
8.2 Fórmulas para la preparación de geles .....	43
8.3 Fórmulas para buffers de gel y de electrodos .....	44
8.4 Fórmulas para el revelado	
8.4.1 Fosfatasa Acida .....	44
8.4.2 Alcohol Deshidrogenasa .....	45
8.4.3 Esterasa .....	45
8.4.4 Transaminasa Glutámico Oxaloacética .....	46
8.4.5 Malato Deshidrogenasa .....	46
8.4.6 Enzima Málica .....	47
8.4.7 6-Fosfogluconato Deshidrogenasa .....	47
8.4.8 Fosfoglucomutasa .....	47
8.4.9 Fosfohexosa Isomerasa .....	48
8.4.10 Shikimato Deshidrogenasa .....	48
8.5 Soluciones Stock para revelado .....	49
8.6 Buffers para revelado (Preparación) .....	50
8.7 Equipo de Laboratorio .....	51

## RESUMEN

Se estudiaron los híbridos dobles de maíz H-28 y H-30 procedentes de INIFAP y PRONASE para conocer su diversidad genética y las distancias genéticas entre sí y sus progenitores, los cuales tienen un bajo nivel de endogamia (S1 a S3). Las distancias genéticas se calcularon mediante dos métodos: el de Nei para un pequeño número de individuos y el de Rogers.

Se estudiaron 10 sistemas enzimáticos (ADH, ME, EST, ACP, PHI, PGM, 6-PGD, MDH, SAD, y GOT) para un total de 21 loci y 37 alelos.

El Índice de Diversidad Genética tuvo los valores más altos ( $H > 0.19$ ) para los genotipos H-28 I, H-28 P, M-15XM-16, M-17, H-30 P, M-29XM-30, M-27 y M-28; cinco de los cuales son híbridos simples o dobles, lo cual comprueba la hipótesis de que los híbridos deben tener mayor variabilidad que las líneas progenitoras, siendo esta la principal característica que se busca al crear los híbridos dobles. Además H-28 I, H-28 P y H-30 P son tres de los cinco genotipos que presentaron el mayor porcentaje de loci polimórficos.

La prueba de t para datos pareados muestra diferencias significativas entre los valores de heterocigosidad observada y esperada para el híbrido M-27XM-28 y entre H-28 I y H-28 P. Esto demuestra que la presión selectiva introducida por el fitomejorador puede no ser homogénea y dar por resultado cambios importantes en las frecuencias alélicas, lo cual conlleva a cambios en el Índice de Diversidad Genética.

No se encontraron diferencias en los análisis de agrupamiento basados en las distancias genéticas cuando se aplicaron las fórmulas de Nei y Rogers para el H-28 y sus progenitores, pero sí hubo diferencias para el H-30, siendo la de Nei la que mostró un agrupamiento más consistente de acuerdo a lo esperado, por ello puede considerarse que esta técnica es más precisa para determinar distancias genéticas en maíz y formar grupos de acuerdo a ellas.

## I. INTRODUCCION

En México los programas de fitomejoramiento de maíz se basan casi exclusivamente en técnicas tradicionales que incluyen la caracterización varietal por medio de la cuantificación y cualificación de caracteres fenotípicos tales como: diámetro y color del tallo, altura de la planta, longitud de la espiga, color de las anteras, número de granos por hilera en la mazorca, número de granos en 100 gramos, etc. Sin embargo, la mayoría de éstos pueden variar por efectos ambientales, de plagas, enfermedades o por la manera como se lleven a cabo las labores de cultivo, además de que tienen un alto índice de subjetividad. También pueden presentarse efectos epistáticos que encubren la manifestación fenotípica de otro tipo de caracteres. Por otro lado, la expresión de estas características normalmente es poligénica, esto es, no se puede atribuir a algún gen dado sino que existen varios de éstos involucrados, por lo que la expresión de estas características no es cercana bioquímicamente al nivel de ADN, por lo cual puede existir gran variedad de eventos modificadores post-traduccionales.

Con lo explicado anteriormente se comprende la dificultad que existe cuando se trata de medir el grado de similaridad -o disimilaridad- de las variedades de maíz, ya que los datos por considerar pueden ser engañosos y se hace necesario un muestreo lo más preciso y con el mayor número de plantas posible, lo cual trae consigo un aumento considerable de trabajo, y por lo tanto, del costo.

En años recientes se han desarrollado o mejorado técnicas de caracterización molecular que utilizan como herramienta principal la

manipulación del propio ADN genómico o los productos de su transcripción inmediata como las isoenzimas; con ellas es posible obtener información más precisa y complementar adecuadamente las técnicas tradicionales. Algunas de estas técnicas son: Electroforesis de Isoenzimas, Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), y Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar (RAPD).

La electroforesis de isoenzimas es una forma fácil, rápida y relativamente barata de obtener una "huella digital" del genotipo de la planta, por medio de la actividad catalítica de las enzimas embebidas en una matriz gelatinosa y separadas por el efecto de un voltaje y una corriente eléctrica.

las ventajas de esta técnica son:

1.- Las isoenzimas representan la expresión directa de un gen tomando en cuenta que las modificaciones postraduccionales son poco frecuentes, por lo que es posible atribuir el patrón de bandas de un zimograma a ciertos alelos específicos y definir genotipos individuales o caracterizar el pool genético de una población.

2.- La expresión de las isoenzimas del maíz no tiene dependencia directa del medio ambiente, aunque pueden depender de la edad o etapa fenológica de la planta (Soltis y Soltis, 1989). Esto significa que en circunstancias similares y condiciones normales los patrones isoenzimáticos dependerán exclusivamente de las condiciones genéticas del individuo a estudiar.

3.- La electroforesis de isoenzimas puede dar resultados tan confiables como los obtenidos por otras técnicas más sofisticadas como RFLP's y RAPD's (Smith y Smith, 1992; Edwards *et al.*, 1992; Gerdes y Tracy, 1994).

4.- Esta técnica conocer los perfiles isoenzimáticos rápidamente, para un alto número de plantas y para diversos sistemas de isoenzimas.

5.- Para la electroforesis se pueden usar extractos de tejido vegetal provenientes prácticamente de cualquier parte de la planta: coleoptilo, radícula, raíz, hoja, polen, ápices, embriones, cotiledones, etc. (Kephart, 1990).

6.- La expresión de las enzimas está regulada por genes codominantes, lo cual significa que se pueden detectar los dos alelos de una planta diploide heterocigótica para un gen dado.

7.- Normalmente las isoenzimas están libres de efectos epistáticos que enmascaran su expresión.

8.- Es una técnica barata pues se puede aplicar en plántulas recién germinadas e incluso en semillas, economizando, además de tiempo, los gastos y el trabajo requeridos en la preparación del terreno, fertilización, riego, combate de plagas y malas hierbas, etc.

El sistema de electroforesis que se usará en este estudio puede definirse de manera completa como electroforesis horizontal, unidimensional y continua en gel uniforme de almidón a voltaje constante. Ha sido ampliamente utilizado en los últimos años con buenos resultados y presenta ventajas en el estudio de

las isoenzimas sobre otros sistemas, sobre todo cuando se compara con el sistema comúnmente empleado que requiere la preparación de geles de poliacrilamida, aunque la resolución de ambas técnicas puede ser igualmente buena. Estas ventajas se pueden resumir en las siguientes:

1.- El almidón es más seguro en su manejo, en contraste con la acrilamida que tiene propiedades neurotóxicas.

2.- Con una muestra de aproximadamente 10 $\mu$ L embebida en una mecha de papel filtro se pueden revelar hasta 6 sistemas enzimáticos diferentes en un sólo gel.

3.- La conservación de los zimogramas es sencilla y de fácil manejo, pues adquieren las características de una película plástica que no requiere condiciones especiales.

4.- La colocación de las muestras en los geles es sumamente accesible y requiere de unos minutos para llevarse a cabo.

5.- En un solo día se pueden correr cómodamente cuatro geles pudiéndose revelar hasta 20 sistemas enzimáticos diferentes para 30 muestras, o bien, 10 sistemas para 60 muestras.

Con base en lo expresado se proponen los siguientes objetivos a desarrollar en la presente tesis:

1.- Evaluar y comparar las distancias genéticas de dos híbridos dobles - incluyendo dos procedencias diferentes -y sus líneas progenitoras con bajo nivel de endogamia.

2.- Determinar la utilidad de dos métodos de medición de distancias genéticas, ampliamente usados, mediante la construcción y comparación de dendogramas por análisis de agrupamiento.

3.- Aplicar el Índice de Heterocigocidad para conocer la diversidad genética y el polimorfismo del material a estudiar.

4.- Comprobar si los genotipos de los híbridos dobles se mantiene similar a pesar de su procedencia distinta.

## II. ANTECEDENTES

El término isoenzima fue propuesto por Markert y Moller (1959) para describir diferentes formas moleculares de enzimas que presentan especificidad por el mismo sustrato. Encontraron diversas formas moleculares de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) cuando compararon los zimogramas de muestras de corazón de res con los obtenidos en muestras en geles de almidón de corazón de ovejas, cerdos, ratones y conejos. También descubrieron diferencias en cuanto a las bandas de la enzima que se presentaba y a la cantidad de ésta expresada en cada banda, al comparar tejidos adultos y embrionicos. Así, demostraron que las isoenzimas muestran especificidad en cuanto al tejido y la etapa de desarrollo. La electroforesis en geles de almidón fué desarrollada por Smithies (1955). Posteriormente Hunter y Markert (1957) comprobaron que las enzimas podían detectarse en el gel si se teñían con los reactivos específicos; fueron ellos quienes propusieron el término zimograma para referirse a la disposición en que se localizan las diferentes isoenzimas.

A partir de estos conocimientos hubo un gran avance en el entendimiento de diversos procesos bioquímicos y fisiológicos en una amplia variedad de plantas como maíz, trigo, frijol, tomate y otras. Se realizaron investigaciones en el campo de la infección viral (Farkas y Stahman, 1966), el efecto de las fitohormonas sobre la expresión de las isoenzimas (Varner y Chandra, 1964; Jacobsen et al., 1970; Ockerse et al, 1966), y en citogenética (Shepard, 1966, Barber et al, 1968; Bergman y Maan, 1973; Irani y Bhatia, 1972; Bhatia y Smith, 1966; Barber et al, 1969; McDonalds y Smith, 1972; y Hart et al, 1976), y en los mecanismos de evolución molecular (Colgan, 1992; Skibinski *et al.*, 1993; Watt, 1994).

El maíz es uno de los cultivos más extensamente estudiado, pues presenta una gran cantidad de marcadores moleculares que permitieron la construcción de un mapa genético para las isoenzimas. En 1964, Scandalios demostró que la aminopeptidasa, esterasa, peroxidasa y catalasa exhibían bandas específicas para ciertos tejidos, y dos años después (1966) que la amilasa está codificada por dos genes Amy-1 y Amy-2. Chao y Scandalios (1971) concluyeron que estos genes presentan herencia codominante, pero Amy-1 además muestra expresión alélica diferencial que depende del tejido estudiado y la edad de la planta.

La enzima Alcohol Deshidrogenasa (ADH) fue estudiada por Scandalios (1967) quien encontró que está codificada por dos genes y controlada por un inhibidor endógeno, además de que los genes de la ADH son sintetizados en respuesta a las condiciones anaeróbicas (Sachset et al., 1980). La ADH es una enzima que se encuentra en semilla, plántula y polen de maíz, pero no en hojas maduras (Freeling y Bennett, 1985), y cuenta con un peso molecular de 80,000 daltons (Freeling y Scwartz, 1973).

La enzima Transaminasa Glutámico-Oxaloacética (GOT) cataliza la reacción reversible del glutamato y oxaloacetato a 2- oxoglutarato y aspartato, distribuyendo el nitrógeno originalmente asimilado dentro del glutamato y otros compuestos (Newton K. J., 1983). En maíz las isoenzimas de la GOT se encuentran en todos los tejidos (Scandalios et al., (1975).

Probablemente la enzima más estudiada en maíz -junto con la ADH- es la Malato Deshidrogenasa-NAD dependiente (MDH). La MDH cataliza la conversión reversible del malato a oxaloacetato que es una reacción

constituyente del ciclo TCA mitocondrial (Newton, K. J., 1983). Una revisión completa de esta enzima fue realizada por Gottlieb (1982), donde indica la existencia de formas mitocondriales, citosólicas y de los microcuerpos. Goodman *et al.* (1980) afirman que las formas mitocondriales son inactivadas cuando se usa ácido ascórbico en lugar de ascorbato de sodio, pudiendo ser esta una manera de diferenciarlas. Las isoenzimas de los microcuerpos por su carácter básico prácticamente no migran hacia el ánodo. El peso de las dos subunidades de la MDH del maíz es aproximadamente de 37,000 a 38,000 daltons (Feri *et al.*, 1983). Goodman y Stuber (1982) describieron un modificador de las MDH's mitocondriales que es un gen nuclear llamado Mmm. Un alelo recesivo raro de este gen llamado mmm cuando se encuentra en estado homocigótico produce una migración ligeramente mayor de todas las MDH's mitocondriales, pero no tiene efecto sobre las MDH's citosólicas.

La Fosfatasa Acida (ACP) fué purificada y caracterizada por Miernyk (1992) a partir de cultivos de endospermo de maíz encontrando que el peso de cada subunidad es de 30,000 daltons, y que su estructura puede ser monomérica y homodimérica.

Con el uso de la electroforesis de isoenzimas ha sido posible el análisis de la estructura genética de las poblaciones, ya que permite determinar los genotipos individuales de las plantas; quizá la mayor desventaja de esta técnica es que sólo aproximadamente un cuarto de las sustituciones de bases resultan en reemplazos de aminoácidos que alteran la carga neta de las enzimas, por lo tanto, diversas sustituciones no son detectadas con facilidad (Brown y Weir, 1983).

Stuber y Moll (1972) estudiaron los cambios en la frecuencia de los alelos de las enzimas Catalasa y Fosfatasa Acida encontrando una correlación entre el locus *Acp1* y el rendimiento del grano. El estudio se realizó a través de 20 generaciones de poblaciones apareadas al azar y 9 ciclos de selección en poblaciones de selección masal. La frecuencia del alelo F de *Acp1* cambió de 0.50 a 0.76 en los primeros 6 ciclos de selección.

Nei (1972) desarrolló una fórmula basada en las frecuencias alélicas para calcular el grado de similaridad entre dos poblaciones, esta fórmula es conocida como "Distancia Genética de Nei". Posteriormente (1978) la adecuó para calcular la distancia genética entre poblaciones donde se estudia un pequeño número de individuos, estableciendo que es más significativo tener un gran número de loci que de individuos; asimismo determinó la fórmula para calcular la heterocigosidad en este tipo de estudios.

Rogers (1972) definió una fórmula para medir la distancia genética basada en el número de loci más que en el de individuos. Con el desarrollo de estos y otros medios para medir similaridades genéticas fue posible empezar el estudio de las estructuras genéticas de distintas poblaciones en las más diversas condiciones; así, Goodman *et al.* (1980) examinaron las relaciones de enlace de 19 loci enzimáticos de maíz y reportaron las localizaciones cromosómicas de 8 de ellos. Hadjinov *et al.* (1982) estudiaron la interrelación entre la diversidad isoenzimática y la capacidad combinatoria general y específica en líneas de maíz, encontraron que a un índice de diversidad enzimática constante la capacidad combinatoria varía considerablemente de acuerdo con las condiciones de prueba y las líneas usadas. Cardy y Kannenberg (1982) comprobaron que la variabilidad en las alozimas puede ser utilizada de manera

efectiva en la identificación de cultivares. Smith (1984) empleó embriones de maíz y encontró que son tan útiles como el coleoptilo para determinar la variabilidad genética de una población. Bretting *et al.* (1990) clasificaron las razas de maíz de Guatemala mediante el uso de isoenzimas demostrando que los patrones isoenzimáticos variaban con la altitud; además esta clasificación concordó con la hecha mediante análisis fitogenéticos. Llauradó *et al.* (1993) clasificaron las poblaciones de maíz mediante el uso de métodos por taxonomía numérica basándose en el empleo de isoenzimas. Smith y Smith (1992) y Gerdes y Tracy (1994) determinaron la diversidad genética de germoplasma de maíz comparando datos de isoenzimas, RFLP's, morfológicos y de pedigree; ambos trabajos concluyeron que RFLP's e isoenzimas se correlacionaban positivamente con los datos de pedigree, aunque los RFLP's presentaron mayor correlación cuando las muestras estudiadas tenían un origen o un parentesco muy cercano.

Doebley *et al.* (1985) trabajaron sobre la variación isoenzimática en las razas de maíz de México usando 94 colecciones pertenecientes a 34 razas; encontraron una variación excepcionalmente alta entre y dentro de éstas con un promedio de 7.09 alelos por locus y heterocigosidad esperada de 0.182. El 72% de la variación residió dentro de colecciones y 27% entre colecciones. Las razas con mayor variación resultaron ser las del norte y noroeste. Además determinaron que la variación de algunos alelos entre razas está fuertemente relacionada con la altitud.

Salanoubat y Pernes (1986) investigaron el polimorfismo entre y dentro de poblaciones de maíz, descubrieron fuertes correlaciones entre la diversidad de las poblaciones y su localización geográfica; afirmaron también que el pool

genético del maíz americano es mayor que el de la población europea examinada. Pollock y Gardner (1986) estudiaron la relación entre los loci enzimáticos heterocigóticos y los caracteres simples de las plantas como la selección masal en dos poblaciones de polinización libre de maíz; sin embargo, no encontraron una relación significativa entre el número de loci enzimáticos heterocigóticos y los caracteres morfológicos. Frei *et al.* (1986) usaron las alozimas como marcadores genéticos para predecir la viabilidad en híbridos simples de maíz, encontraron algunas asociaciones entre las alozimas presentes y la genealogía de la línea, esto no sucedió con el testigo B73, lo cual indica la posibilidad de excepciones dependiendo del testigo. Edwards *et al.* (1992) correlacionaron la presencia de marcadores moleculares (RFLP's y 16 loci de isoenzimas) con caracteres cuantitativos de maíz (QTL's) tales como peso del grano, número de hileras de grano, altura de la planta, etc. Ellos encontraron que ambos tipos de marcadores presentan frecuencias similares de asociaciones significativas con los QTL's, lo cual sienta las bases para conocer los genes mayores responsables de la expresión de estos.

### III. MATERIALES Y METODOS

Este estudio se realizó en instalaciones del Laboratorio de Biotecnología del Campo Experimental del Valle de México (CEVAMEX), perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH), a cargo de la Dra. H. Susana Azpiroz Rivero, y en el Laboratorio de Cruzas Amplias de Maíz del Centro Internacional para el Mejoramiento del Maíz y Trigo (CIMMYT) a cargo del Dr. Julian Berthaud.

Las muestras de semilla fueron proporcionadas por el Ing. Alejandro Espinoza Calderón encargado del Programa de Tecnología de Semillas del CEVAMEX. Se analizaron los híbridos dobles H-28 Y H-30, ambos con procedencia de INIFAP y la Productora Nacional de Semillas (PRONASE), así como sus respectivos híbridos simples y líneas progenitoras. Las genealogías se especifican en los Cuadros 1 y 2.

<b>Cuadro 1. Genealogía de los Híbridos Dobles H-28 y H-30</b>	
<b>Hibrido</b>	<b>Genealogía</b>
H-28	M-15XM-16 X M-17XM-18
H-30	M-27XM-28 X M-29XM-30

### 3.1. Preparación de la Muestra

Se desinfectaron 10 semillas de cada variedad con hipoclorito de sodio comercial al 15% durante 10 minutos y se sembraron bajo la campana de flujo laminar en cajas Petri de vidrio previamente esterilizadas y acondicionadas con papel filtro humedecido en agua estéril. Las cajas se sellaron con hule Kleen Pack y se colocaron en la cámara de incubación, hasta su germinación.

**Cuadro 2. Genealogía de las Líneas Progenitoras**

<b>Línea</b>	<b>Genealogía</b>
M-15	Mich 21-26
M-16	Mex 39 Comp 1 X Mich 21-20
M-17	Mich 21 Comp 1-27-2
M-18	Comp 1-7-2
M-27	Mich 21 Comp 1-18-3
M-28	Mich 21-181-14-1
M-29	Mich 21-88-3-3
M-30	CR-439

Después de 5-8 días de la germinación, cuando el coleoptilo alcanzó un tamaño de aproximadamente 2 cm, se cortó y se pesó para colocarlo dentro de un tubo de microcentrífuga tipo Eppendorf de 1.5 ml. El peso del coleoptilo en miligramos se multiplicó por dos y la cantidad resultante se le agregó en microlitros del buffer de extracción (ver en el Apéndice la formulación de las

soluciones que se mencionan en el presente estudio). A partir de este momento todo el proceso se llevó a cabo en frío para evitar la desnaturalización de las enzimas.

El coleoptilo de cada microtubo se maceró con un taladro al que se le adaptó una punta plástica. Posteriormente se centrifugó por ocho minutos en una microcentrífuga colocada en la cámara fría (4°C). Del sobrenadante se tomaron cuatro alícuotas de 20 microlitros cada una, se congelaron a -80°C y posteriormente se usaron como muestras para los corrimientos electroforéticos.

### **3.2. Preparación del gel.**

A partir de este paso se usó la técnica descrita por Goodman et al. (1988) con algunas modificaciones.

Se emplearon dos tipos de gel de almidón: gel C y gel D (ver formulación en el Apéndice). Ambos se prepararon de la misma manera: las cantidades correspondientes de almidón y sacarosa (ver apéndice B) se pesaron y se mezclaron en un matraz Kitazato de 1000 ml. En otro matraz Erlenmeyer se preparó el buffer para el gel, midiendo con probeta las cantidades adecuadas de buffer y agua destilada; se agregaron alrededor de 100 mililitros de este buffer en el matraz de la mezcla de almidón-sacarosa y se colocó en un agitador magnético; mientras, el resto del buffer se calentó hasta ebullición en un horno de microondas. El buffer hirviente se vació en la suspensión almidón-sacarosa, se le quitó rápidamente el magneto agitador, se introdujo al horno y se calentó a ebullición durante 7 minutos hasta adquirir una apariencia

cristalina y sin burbujas de aire e inmediatamente se desgasificó con una bomba de vacío.

El gel preparado de esta manera se vació en un molde de acrílico para su enfriamiento durante alrededor de una hora, posteriormente se cubrió con una bolsa plástica para evitar su excesiva deshidratación. Al día siguiente, antes del corrimiento, el gel se guardó en el refrigerador durante media hora. Después de esto en uno de los extremos se realizó un corte transversal para insertar las muestras.

Para tomar las muestras de las alícuotas previamente descongeladas se introdujo una mecha de papel filtro de 11 x 3 mm en el microtubo para mojarla en ellas, posteriormente con otro papel filtro se eliminó el exceso y se procedió a insertarla en el corte practicado en el gel; de esta manera se colocaron 25 muestras por gel.

En cada corrimiento se colocaron dos mechas con azul de bromofenol como marcador para observar el movimiento del frente del buffer, y de 3 a 5 muestras de líneas puras de maíz como testigos, éstas líneas fueron las siguientes: Mo41, CM37, Mt42, T232, B73, Mo17 y A632.

Una vez depositadas las muestras, al lado del gel donde se efectuó el corte se colocó un popote para asegurar un buen contacto entre las dos secciones; la parte superior se cubrió con plástico y adicionalmente se enfrió con una bolsa o charola con hielo. De esta manera el gel estuvo listo para introducirlo en la cámara fría, dentro de las cubas de electroforesis con el buffer para cada tipo de gel y llevar a cabo el corrimiento. El gel C se corrió a

175 V y 80 mA durante 7 horas, y el D se corrió a 250 V y 30 mA durante el mismo tiempo.

### 3.3. Revelado de las muestras

Al término del tiempo de corrimiento se procedió al revelado de los sistemas enzimáticos específicos de acuerdo con cada tipo de gel, tal como lo muestra el Cuadro 3.

Cuadro 3. Sistemas Enzimáticos Revelados	
Tipo de Gel	Sistemas Enzimáticos
GEL C	ALCOHOL DESHIDROGENASA (ADH) ESTERASA (EST) TRANSAMINASA GLUTAMICO OXALOA- CETICA (GOT)
GEL D	SHIKIMATO DESHIDROGENASA (SAD) FOSFOGLUCOMUTASA (PGM) FOSFOHEXOSA ISOMERASA (PHI) 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGE- NASA (6-PGD) MALATO DESHIDROGENASA (MDH) ENZIMA MALICA (ME) FOSFATASA ACIDA (ACPH)

El gel se extrajo de la cámara fría, se secó perfectamente, se colocó en una tabla de acrílico con dos rieles, y con un arco cortador se procedió a la obtención de rebanadas, normalmente 5. Cada una de éstas se colocó en una

cuba de revelado donde posteriormente se le agregó la solución de sustrato específica para cada sistema enzimático (ver Apéndice).

Las rebanadas con los sustratos se incubaron a 36 °C hasta que se obtuvo una buena definición de las bandas; se procedió a enjuagar con agua corriente cada una de éstas y se pasaron al fijador, el que consistió en una solución de ácido acético, metanol y agua 1:5:5, durante 24 horas. Después de la fijación las rebanadas se enjuagaron nuevamente con agua corriente y se pasaron a una solución de glicerol al 10% durante 24 horas. Estos dos últimos pasos se llevaron a cabo sobre un agitador orbital. De esta manera, las rebanadas quedaron listas para su conservación, que se realizó de la siguiente manera: se cortaron dos cuadros de papel celofán, se empaparon con glicerol al 10% y uno de ellos se colocó sobre un cristal de mayor tamaño que la rebanada de gel, sobre ésta se colocaron las rebanadas que se encontraban en glicerol, y se cubrieron con la otra parte de celofán con cuidado para no dejar burbujas de aire y doblar los bordes sobrantes del celofán bajo el cristal. Estos se guardaron en oscuridad hasta que el gel se deshidrató y adquirió una consistencia flexible y casi transparente, destacando las bandas formadas por las isoenzimas. En este momento, las rebanadas estuvieron listas para su análisis.

### **3.4. Análisis Estadístico**

Una vez identificados los alelos de cada zimograma se calculó la frecuencia alélica de cada uno mediante la fórmula:

donde: a = número de homocigotos  
para el alelo a.

$$f(a) = 2a + ab/2n$$

ab = número de heterocigotos.

n = número de individuos.

Con las frecuencias alélicas obtenidas se procedió al cálculo de las distancias genéticas entre genotipos usando la fórmula de Nei para un pequeño número de individuos

$$D = -\ln \left[ \frac{\sum p_i q_i}{\sqrt{(2n \sum p_i^2 - 1)(2n \sum q_i^2 - 1) / 2n - 1}} \right]$$

donde:  $\sum p_i q_i$  = suma de los productos de la multiplicación del i-ésimo alelo de la población p por el i-ésimo alelo de la población q

$\sum p_i^2$  = suma de los cuadrados del i-ésimo alelo de la población p

$\sum q_i^2$  = suma de los cuadrados del i-ésimo alelo de la población q

n = número de individuos estudiados por población

y la fórmula de Rogers

$$D_{ij} = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (p_{ik} - p_{jk})^2}{2L}}$$

donde:  $p_{ik}$  = frecuencia del alelo k en la población i  
 $p_{jk}$  = frecuencia del alelo k en la población j  
L = número de loci  
n = número total de alelos

Con la matriz obtenida se procedió a la construcción de dendogramas para cada híbrido doble y sus progenitores.

Por otra parte, con dichas frecuencias se calculó el Índice de Heterocigosidad con la fórmula:

$$H = \sum_{r=1}^r h_k / r$$

$$h_k = 2n ( 1 - \sum x_i^2 ) / 2n-1$$

donde:  $r$  = número total de loci  
 $n$  = número de individuos  
 $x_i$  = frecuencia del i'ésimo alelo

para conocer y comparar la diversidad genética de cada variedad. Se aplicó una prueba de t para datos pareados entre los valores de heterocigosidad observada y esperada para cada híbrido simple y doble para conocer si las diferencias encontradas eran significativas, para ello se tomaron como base las frecuencias alélicas de las líneas progenitoras y se calcularon las frecuencias esperadas al producirse los híbridos, con estas frecuencias se calcularon los valores de

heterocigosidad esperada en la forma ya descrita. Adicionalmente se calculó el Porcentaje de Loci Polimórficos, la Riqueza de alelos y el Número Promedio de Alelos por Locus.

#### IV. RESULTADOS

En el cuadro 4 se muestran los 10 sistemas enzimáticos utilizados, los cuales cubren al menos 7 de los 10 cromosomas del maíz con un total de 22 loci y 37 alelos (ver zimogramas con los alelos representativos en el apéndice A). Las enzimas que presentaron un mayor número de loci fueron Malato deshidrogenasa (MDH) con 5, Transaminasa Glutámico Oxaloacética (GOT) y Enzima Málica (ME) con 3 loci respectivamente.

**Cuadro 4. Enzimas, Número de Loci y Localización Cromosómica**

ENZIMA	NUMERO DE LOCI	LOCALIZACION
Alcohol Deshidrogenasa	2	1
Enzima Málica	3	?
Esterasa	1	3N
Fosfatasa Acida	1	9
Fosfohexosa Isomerasa	1	1
Fosfoglucomutasa	2	1 y 5
6-Fosfogluconato		3 y 6
Deshidrogenasa	2	
Malato Deshidrogenasa	5	1, 3, 5, 6 y 8
Shikimato Deshidrogenasa	1	10
Transaminasa Glutámico		
Oxaloacética	3	3 y 5

En el cuadro 5 se observa la frecuencia de los alelos encontrados por locus y por genotipo.

En el cuadro 6 se observa la Riqueza de Alelos, el Número de Loci Polimórficos y el Porcentaje de Loci Polimórficos, los genotipos que presentaron mayor Riqueza de Alelos fueron H-28 I, M-28 X M-27, M-28, H-28 P, M-15 X M-16 y H-30 P, y los de mayor número de loci polimórficos H-28 I, H-28 P, M-17, M-17, H-30 P y M-28. Los loci que presentaron polimorfismo en un mayor número de genotipos fueron Mdh1 y Mdh2, polimórficos en los 16 genotipos, Me2 en 15, Sad1 en 12, Got1 en 11, Pgm1 en 10 y E1 en 10.

**Cuadro 5. Frecuencias Alélicas por Loci y Genotipo.**

Alelo	H28I	H28P	M-15 X M-16	M-15	M-16	M-17 X M-18	M-17	M-18	H30I	H30P	M-27 X M-28	M-27	M-28	M-29 X M-30	M-29	M-30
Adh1-4	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Adh2-1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.7	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Got1-4	0.6	0.95	0.55	0.95	1.0	1.0	1.0	1.0	0.7	0.95	0.8	0.6	0.85	0.85	1.0	0.95
Got1-6	0.4	0.05	0.45	0.05	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.05	0.2	0.4	0.15	0.15	0.0	0.05
Got2-4	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Got3-4	0.5	1.0	0.1	1.0	0.0	0.0	0.6	1.0	1.0	0.0	1.0	0.5	1.0	0.4	0.1	1.0
Pgm1-9	0.8	0.85	1.0	1.0	1.0	0.5	0.65	0.65	1.0	0.75	0.75	0.5	0.8	0.9	1.0	1.0
Pgm2-8	0.2	0.15	0.0	0.0	0.0	0.5	0.35	0.35	0.0	0.25	0.25	0.5	0.2	0.1	0.0	0.0
Phi1-3	0.2	0.25	0.6	0.1	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.05	0.05	0.0	0.25	0.0	0.0	0.25
Phi1-4	0.8	0.75	0.4	0.9	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.95	0.95	1.0	0.75	1.0	1.0	0.75
6pgd1-3.8	1.0	0.3	1.0	0.0	1.0	0.0	0.4	1.0	1.0	0.2	0.3	0.3	0.9	0.0	0.0	0.0
6pgd1-2.5	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

continúa...

...continuación

Aep1-3	0.8	1.0	0.6	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Aep1-6	0.2	0.0	0.41	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Me1-1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Me2-1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.65	0.5	0.35	0.5	0.5	0.5	0.05	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Me2-2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.35	0.5	0.65	0.5	0.5	0.5	0.95	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Me3-1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Sad1-4	0.5	0.5	0.75	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	0.5	1.0	0.55	0.55	0.5	0.9	1.0
Sad1-2	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.0	0.0	0.5	0.0	0.45	0.45	0.5	0.1	0.0
E-1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
E8-2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.6	0.0
E8-3	1.0	0.3	1.0	1.0	1.0	1.0	0.2	0.0	0.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
E7-1	0.5	0.75	0.5	1.0	0.25	0.5	0.4	1.0	0.5	0.95	1.0	0.5	0.8	0.35	0.7	1.0
E7-2	0.5	0.25	0.5	0.0	0.75	0.5	0.6	0.0	0.5	0.05	0.0	0.5	0.2	0.65	0.3	0.0
E6-2-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.05	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
E6-1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.95	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Mdh1-1	0.5	0.5	0.2	0.45	0.05	0.1	0.6	0.45	0.5	0.5	0.5	0.4	0.5	0.2	0.5	0.3
Mdh1-6	0.5	0.5	0.8	0.55	0.95	0.9	0.4	0.55	0.5	0.95	0.5	0.6	0.5	0.8	0.5	0.7
Mdh2-3	0.5	0.4	0.2	0.1	0.5	0.5	0.6	0.0	0.5	0.2	0.5	0.1	0.4	0.5	0.5	0.35
Mdh2-6	0.5	0.6	0.8	0.9	0.5	0.5	0.4	0.8	0.0	0.8	0.5	0.9	0.6	0.5	0.5	0.65
Mdh2-n	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mdh4-12	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Mdh5-12	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.95	1.0	1.0	1.0	0.55	1.0	1.0
Mdh5-15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.05	0.0	0.0	0.0	0.45	0.0	0.0
Mdh-mm	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0
Mdh-Mm	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.95	1.0	1.0	1.0

En el cuadro 6 también se encuentran los valores de Heterocigosidad ó Diversidad Genética. Para el H-28 y progenitores, se observa que el valor mayor lo presentó el H-28 I seguido por el híbrido simple M-15XM-16. Para el H-30 y progenitores el valor más grande lo presentó la línea M-27 seguida del híbrido simple M-29XM-30 y la línea M-28.

Con las frecuencias alélicas observadas en las líneas progenitoras se calcularon las frecuencias alélicas esperadas para los híbridos simples y dobles y con estas se calcularon los valores de heterocigosidad esperada para dichos híbridos. A continuación se aplicó la prueba de t para datos pareados con un nivel de significancia del 5% para comprobar si había diferencias significativas entre los valores de Heterocigosidad observada y esperada (ver página 36). Se encontró diferencia significativa en el híbrido M-27XM-28. La t calculada entre H-28 I y H-28 P se encuentra prácticamente en el valor límite entre la región de aceptación y rechazo de la hipótesis nula ( $t^{0.05}=2.08$ ,  $t_{\text{calc}} = 2.04$ ).

Para cada híbrido doble y sus progenitores se calcularon las distancias genéticas mediante las fórmulas de Nei para un pequeño número de individuos y la de Rogers, las cuales dieron por resultado la construcción de matrices rectangulares (ver cuadros 7, 8, 9 y 10) a partir de las cuales se realizaron análisis de agrupamiento para cada híbrido doble mismos que dieron por resultado la construcción de dendogramas por híbrido y por fórmula. La técnica empleada fué Dendograma de Distancias Mínimas ya que las distancias genéticas entre genotipos son reducidas por haber sido sometidos a endogamia.

**Cuadro 6. Número y Riqueza de Alelos, Porcentaje de Loci Polimórficos y Heterocigosidad (H).**

GENOTIPO	NO. DE ALELOS	RIQUEZA DE ALELOS	% LOCI POLIMORFICOS	H
H-28I	33	1.43	43.5	0.242
H-28P	32	1.39	43.5	0.193
M-15 x M-16	32	1.39	39.1	0.222
M-15	29	1.26	26.1	0.117
M-16	28	1.22	21.7	0.143
M-17 X M-18	28	1.22	26.1	0.152
M-17	29	1.26	43.5	0.218
M-18	27	1.17	17.4	0.109
H-30 I	29	1.26	26.1	0.155
H-30 P	32	1.39	43.5	0.162
M-28 x M-27	33	1.43	34.8	0.139
M-27	33	1.35	43.5	0.218
M-28	31	1.43	39.1	0.192
M-29 X M-30	31	1.35	39.1	0.200
M-29	28	1.22	30.4	0.131
M-30	27	1.17	21.7	0.088

**Cuadro 7. Distancias genéticas de Rogers entre el H-28 y sus progenitores.**

	H-28 I	H-28 P	M15XM16	M-15	M-16	M17XM18	M-17	M-18
H-28 I	0.00000	0.28536	0.23197	0.41975	0.35085	0.32587	0.28702	0.38791
H-28 P	0.28536	0.00000	0.39219	0.37670	0.44320	0.33947	0.20354	0.29115
M15XM16	0.23197	0.39219	0.00000	0.44293	0.27386	0.39521	0.42873	0.45408
M-15	0.41975	0.37670	0.44293	0.00000	0.59502	0.46752	0.46955	0.47958
M-16	0.35085	0.44320	0.27386	0.59502	0.00000	0.41833	0.46522	0.56125
M17XM18	0.32587	0.33947	0.39521	0.46752	0.41833	0.00000	0.29921	0.47157
M-17	0.28702	0.20354	0.42873	0.46955	0.46522	0.29921	0.00000	0.34641
M-18	0.38791	0.28115	0.45408	0.47958	0.56125	0.47157	0.34641	0.00000

**Cuadro 8. Distancias genéticas de Nei entre el H-28 y sus progenitores.**

	H-28 I	H-28 P	M15XM16	M-15	M-16	M17XM18	M-17	M-18
H-28 I	0.0000	0.0940	0.0782	0.1440	0.1140	0.1082	0.0926	0.1288
H-28 P	0.0940	0.0000	0.1359	0.1247	0.1559	0.1137	0.0694	0.0894
M15XM16	0.0782	0.1359	0.0000	0.1552	0.0877	0.1369	0.1522	0.1603
M-15	0.1440	0.1247	0.1552	0.0000	0.2431	0.1686	0.1683	0.1702
M-16	0.1140	0.1559	0.0877	0.2431	0.0000	0.1432	0.1657	0.2189
M17XM18	0.1082	0.1137	0.1369	0.1686	0.1432	0.0000	0.0967	0.1701
M-17	0.0926	0.0694	0.1522	0.1683	0.1657	0.0967	0.0000	0.1096
M-18	0.1288	0.0894	0.1603	0.1702	0.2189	0.1701	0.1096	0.0000

**Cuadro 9. Distancias genéticas de Rogers entre el H-30 y sus progenitores.**

	H-30 I	H-30 P	M27XM28	M-27	M-28	M29XM30	M-29	M-30
H-30 I	0.00000	0.47958	0.35770	0.31698	0.41086	0.41947	0.40178	0.44535
H-30 P	0.47958	0.00000	0.34894	0.31923	0.25024	0.27036	0.25635	0.37321
M27XM28	0.35770	0.34894	0.00000	0.25514	0.31713	0.36788	0.29897	0.29857
M-27	0.31698	0.31923	0.25514	0.00000	0.26049	0.33345	0.33238	0.34400
M-28	0.41086	0.25024	0.31713	0.26049	0.00000	0.25820	0.30040	0.39400
M29XM30	0.41947	0.27036	0.36788	0.33345	0.25820	0.00000	0.26412	0.39881
M-29	0.40178	0.25635	0.29897	0.33238	0.30040	0.26412	0.00000	0.27817
M-30	0.44535	0.37321	0.29857	0.34400	0.39400	0.39881	0.27817	0.00000

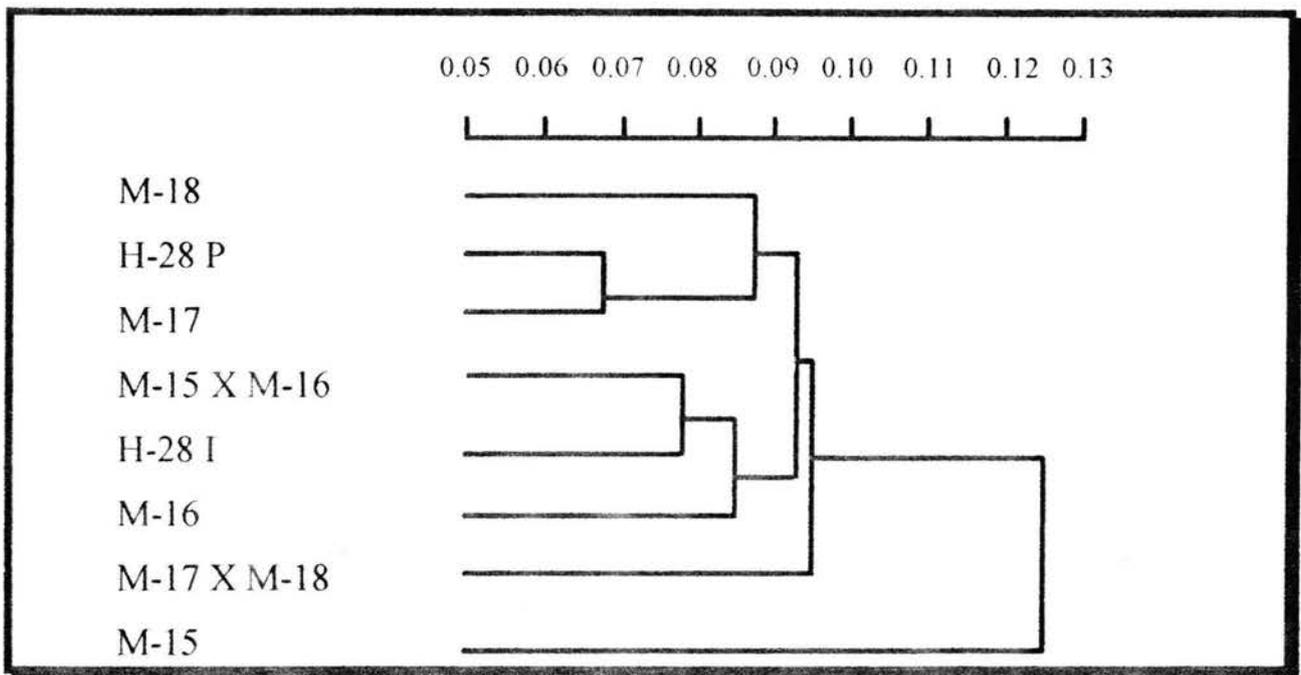
**Cuadro 10. Distancias genéticas de Nei entre el H-30 y sus progenitores**

	H-30 I	H-30 P	M27XM28	M-27	M-28	M29XM30	M-29	M-30
H-30 I	0.0000	0.1757	0.1154	0.1414	0.1016	0.1459	0.1370	0.1565
H-30 P	0.1757	0.0000	0.1432	0.1132	0.1335	0.1191	0.1148	0.1550
M27XM28	0.1154	0.1432	0.0000	0.1016	0.0823	0.1210	0.0954	0.0951
M-28	0.1016	0.1335	0.0823	0.0848	0.0000	0.1091	0.1085	0.1349
M29XM30	0.1459	0.1191	0.1210	0.0860	0.1091	0.0000	0.0877	0.1375
M-29	0.1370	0.1148	0.0954	0.0992	0.1085	0.0877	0.0000	0.0906
M-30	0.1565	0.1550	0.0951	0.1349	0.1119	0.1375	0.0906	0.0000

En la Figura 1 se observa el Dendograma de Distancias Mínimas para el Híbrido Doble H-28 construido con las distancias de Nei. Se puede observar que el H-28 I tiene mayor similitud genética con el híbrido M-15 X M-16 y ambos con la línea M-16. El H-28 P tiene similitud con la línea M-17 y ambos con la línea M-18, a estos dos grupos se une el Híbrido M-17 X M-18 y, por último, separado considerablemente de los demás se encuentra la línea M-15. El Dendograma de Distancias Mínimas obtenido con las distancias de Rogers muestra el mismo tipo de agrupamiento que con las distancias de Nei.

En la Figura 2 se observa el Dendograma de Distancias Mínimas con la distancia de Nei para el H-30, donde se da un agrupamiento lógico que podría representar el caso ideal pues se aprecia como el Híbrido M-28 X M-27 se agrupó con su línea progenitora M-28 e inmediatamente después con su otra línea progenitora M-27. En seguida se encuentra el Híbrido M-29 X M-30 y sus dos líneas progenitoras M-29 y M-30. Después se agrupa el Híbrido Doble H-30 I y por último el H-30 P.

En la Figura 3 se muestra el Dendograma de Distancias Mínimas obtenido con las distancias de Rogers para el H-30. A diferencia de lo encontrado con el Híbrido H-28, los dendogramas para el H-30 mostraron otro tipo de agrupamiento, en éste se observa como el Híbrido M-28 X M-27 se agrupa con la línea M-28 y el Híbrido H-30P con la M-27, a este último par se agrupa la línea M-29 y el Híbrido M-29 X M-30. Después se unen los dos grupos así formados y éstos a la línea M-30, por último se agrupa el Híbrido doble H-30 I



**Figura 1. Dendrograma de Nei para el H-28 y sus progenitores.**

Para comprobar si los Híbridos Dobles H-28 y H-30 de INIFAP y PRONASE se agrupan entre sí se procedió a la construcción de Dendogramas de Distancias Mínimas (Figura 4), resultando un agrupamiento igual con las distancias de Nei y Rogers; en dicha se presenta el Dendograma obtenido con la Distancia de Nei. Es importante observar que los H-28 se agrupan juntos -aunque a distancia amplia- y el H-30 I se une con estos en lugar de hacerlo con el H-30 P.

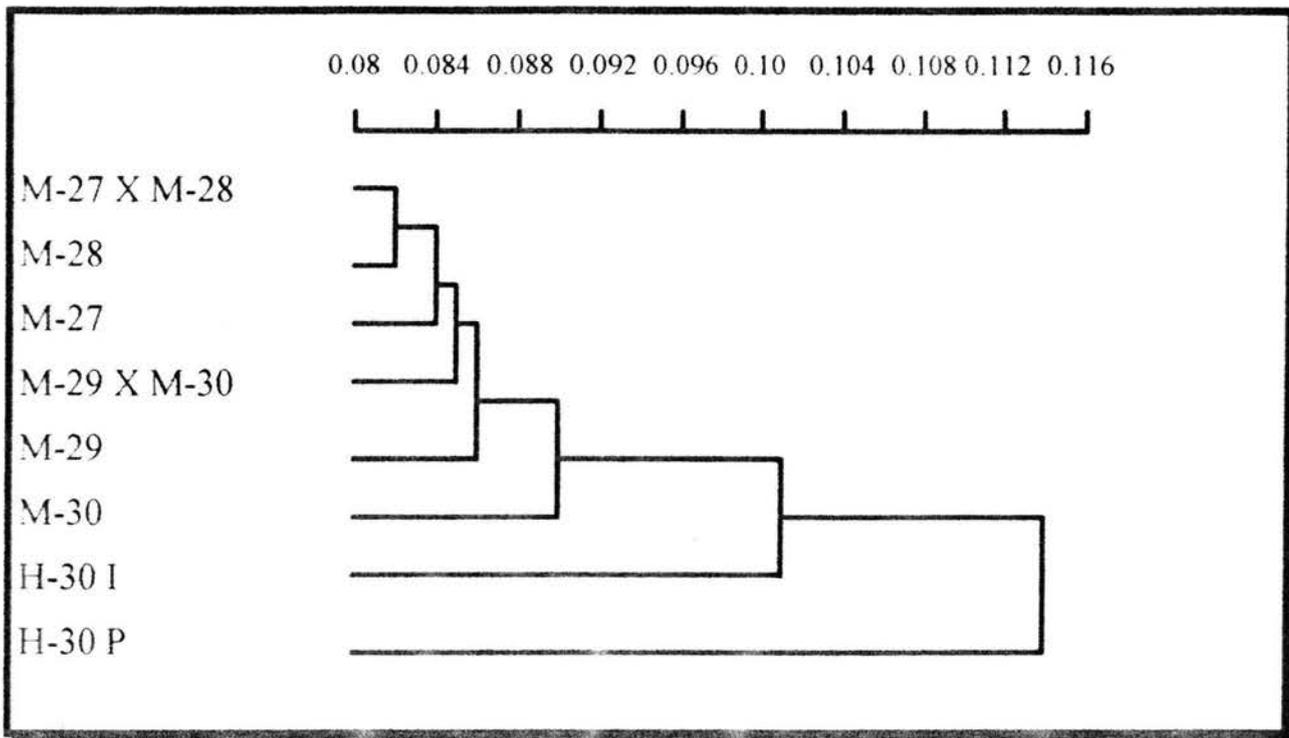


Figura 2. Dendrograma de Nei para el H-30 y sus progenitores.

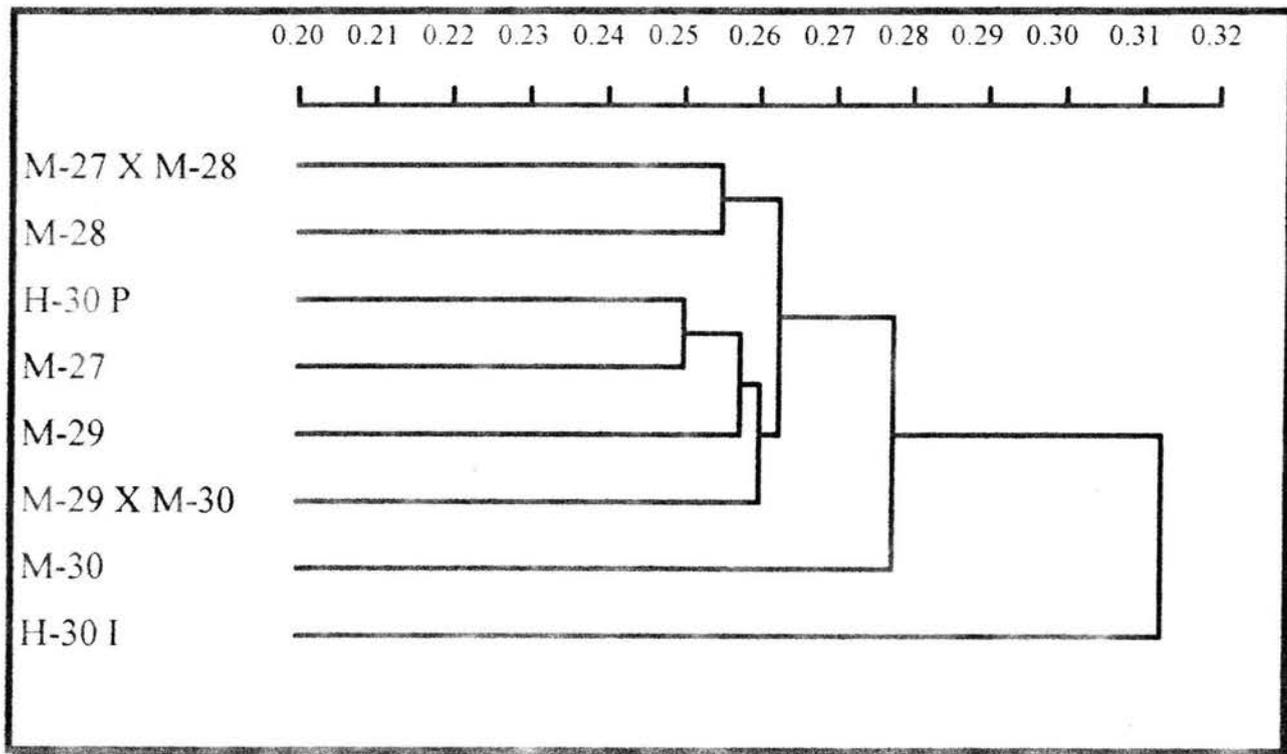
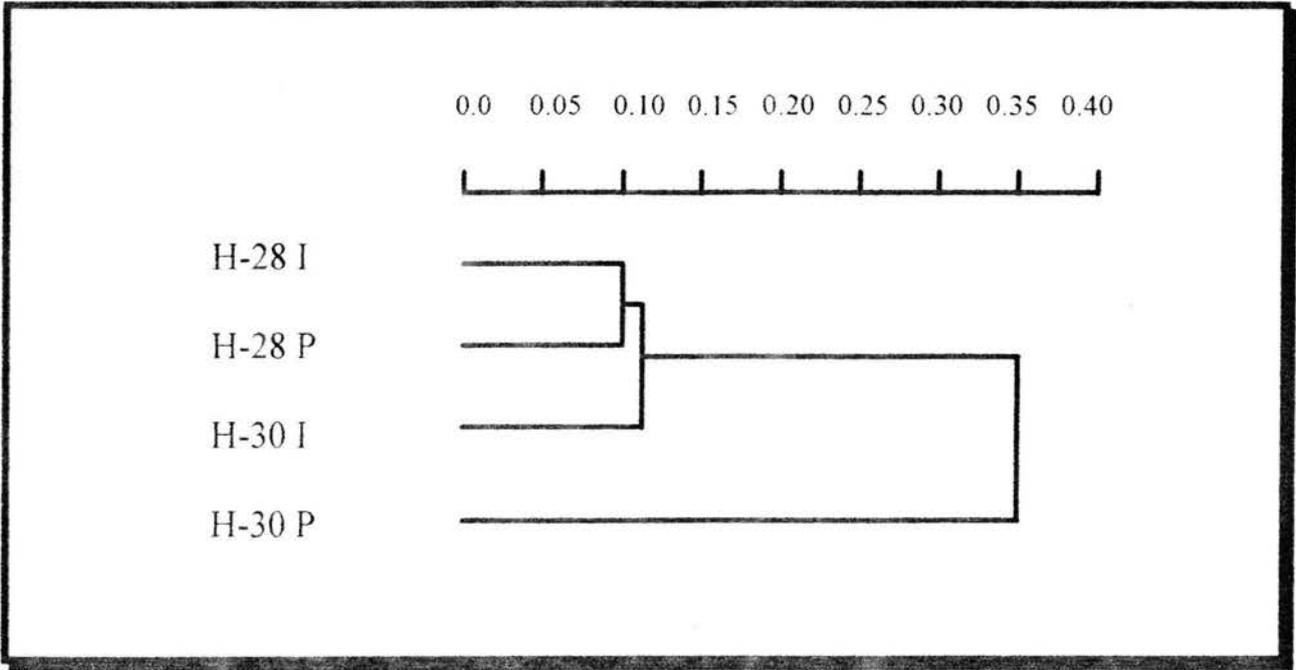


Figura 3. Dendrograma de Roger para el H-30 y sus progenitores.



**Figura 4. Dendrograma de Nei Para los Híbridos Dobles.**

## V. DISCUSION DE RESULTADOS

El número total de alelos encontrado (37) no es grande debido al efecto de la endogamia que, aunque baja, incrementa el nivel de homocigosis hasta al menos un 50% en la primera autofecundación y un 75% en la segunda, lo cual provoca que la variación en algunos genes desaparezca y se fije un solo alelo para ese gen. En todos los genotipos estudiados se encontraron alelos que presentan una frecuencia de 1.0, como Adh1-4, Got2-4, 6-Pgd1-2.5, Me1-1 y otros: así como sistemas enzimáticos que poseen dos o más loci con dos o tres alelos por loci como Mdh1, Mdh2, Mdh5, Got1, Pgm1, Acp1, E8 y otros, los cuales son considerados polimórficos y ya han sido reportados en otras investigaciones con diferentes variedades de maíz (Goodman y Stuber, 1988).

Riqueza de Alelos y Número y Porcentaje de Loci Polimórficos dan una idea general de la variabilidad de cada genotipo, que llega a ser hasta de 43.5%, valor que es alto considerando que los materiales han sido sometidos a un proceso de selección.

El que la variabilidad sea alta es importante, ya que confiere a los materiales estudiados una amplia adaptabilidad a diversas condiciones, característica inherente de los híbridos dobles con líneas progenitoras de alta variabilidad si se considera que fueron creados para rendir aceptablemente no obstante las variaciones ambientales de las regiones donde se cultiven. De tal manera que el campesino podría sembrar exitosamente su propia semilla aun cuando se permitiera la libre polinización, es decir, que estos híbridos dobles se comporten como variedades sintéticas. Como era de esperarse el valor más alto

del Porcentaje de Polimorfismo se presentó en tres de los cuatro híbridos dobles estudiados (H-28 I, H-28 P y H-30 P).

El Índice de Diversidad Genética al igual que el Número y Porcentaje de Loci Polimórficos es bajo considerando que puede alcanzar valores de 0.0 a 1.0, sin embargo, es importante señalar que es extremadamente raro que alguna muestra poblacional estudiada tome el valor de 1.0 pues se requeriría que todos los individuos sean heterocigóticos para cada gen de cada locus y que los dos alelos de cada uno de estos no se repitieran en otro individuo; de tal manera que la diversidad observada para la mayoría de los materiales del presente estudio es alta, tomando en cuenta además que fueron sometidos a uno o dos ciclos de autofecundación.

Es de esperarse que la Diversidad Genética de los Híbridos dobles y simples sea alta por las diferencias genéticas de sus líneas progenitoras, esto sucedió así para el H-28 ya que tanto el material procedente de INIFAP como de PRONASE presentaron valores altos junto con la línea M17. En el caso del H-30 de ambas procedencias el valor de Diversidad Genética o Heterocigosidad fué bajo, presentándose el valor mayor en la línea M-27; esto puede atribuirse a que las líneas progenitoras de este híbrido tienen un origen muy similar ya que se derivan de la población Michoacán 21, al cruzarse estas líneas hermanas provocaron un efecto de consanguinidad ó endogamia más que productor de diversidad lo cual trajo consigo una disminución en la heterocigosidad. Es importante resaltar que este efecto no se presentó en el H-28 ya que sus líneas progenitoras tienen al menos tres orígenes diferentes.

Por otro lado los análisis de agrupamiento basados en las distancias genéticas calculadas con las fórmulas de Nei y Rogers presentaron diferencias importantes en el dendograma construido para el H-30; el del H-28 resultó igual en ambos casos. Esto se debe a que la fórmula de Rogers es más sensible para captar pequeñas diferencias basándose en las diferencias absolutas y en el número de loci, sin embargo, produce un sesgo sistemático cuando el número de individuos es pequeño. En la fórmula de Nei esto ha sido corregido ya que se basa más en el número de loci estudiados que en el número total de individuos; lo cual hace posible eliminar esa fuente de error y arrojar resultados más congruentes, tales como el dendograma para el H-30 obtenido mediante este último sistema, que puede ser considerado un caso ideal de agrupamiento porque cada híbrido simple se agrupó directamente con sus líneas progenitoras y los híbridos dobles tanto del INIFAP como de PRONASE al final. Por otra parte, el dendograma del H-28 aunque no manifestó un agrupamiento tan perfecto como el H-30 sí presentó uno bastante lógico entre líneas e híbridos a excepción de la línea M-15 que se agrupó aparte. Es notorio que el H-28P y el H-30P tienen un comportamiento diferente al H-28 I y H-30 I pues era de esperarse que la distancia genética más pequeña se manifestara entre los H-28 y los H-30, respectivamente, ya que a pesar de proceder de instituciones diferentes se trata de semilla que fue obtenida a partir de las mismas líneas progenitoras. Esto quiere decir que en un dendograma deberían agruparse juntos y a una distancia pequeña. Las desviaciones de este comportamiento son significativas lo cual se comprueba también con el resultado de la prueba de t para datos pareados, esto puede tener su explicación en el hecho de que el INIFAP en los años 70's por única vez entregó a PRONASE semilla original de los híbridos dobles y líneas progenitoras, a partir de entonces esta institución se hizo cargo de producir su propia semilla para mantener e incrementar sus

líneas de tal manera que el manejo de campo a través de los años ha introducido diferencias acumulativas en el material genético original hasta producir los resultados observados en el presente estudio.

El manejo de campo diferencial entre INIFAP y PRONASE que pudiera introducir cambios cuantitativos en el pool genético de las líneas se refiere principalmente al tamaño de las parcelas donde se produce la semilla ya que las del INIFAP son más pequeñas por ser experimentales, es decir, que no se dedican a la producción comercial y por lo tanto el número de individuos con los que se trabaja es menor y sobre éstos actúa con mayor fuerza la presión de selección del fitomejorador, la cual conlleva a cambios en las frecuencias alélicas, que se ven reflejadas en las distancias genéticas.

### Heterocigosidad Observada y Esperada para el H-28.

Locus	H-28 I		H-28 P	M-15XM-16		M-15	M-16	M-17	M-17XM-18		M-18
1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2	0.0	0.146	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.442	0.0	0.268	0.0
3	0.505	0.027	0.100	0.521	0.52	0.100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	0.526	0.479	0.0	0.189	0.526	0.0	0.0	0.505	0.0	0.337	0.0
6	0.337	0.308	0.268	0.0	0.0	0.0	0.0	0.479	0.526	0.481	0.479
7	0.337	0.337	0.461	0.505	0.521	0.189	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
8	0.526	0.481	0.442	0.526	0.461	0.0	0.526	0.505	0.0	0.521	0.526
9	0.337	0.461	0.0	0.505	0.526	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
11	0.526	0.526	0.526	0.526	0.515	0.526	0.479	0.479	0.526	0.515	0.526
12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
13	0.526	0.493	0.526	0.395	0.526	0.526	0.526	0.526	0.526	0.461	0.0
14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
15	0.526	0.442	0.442	0.526	0.526	0.526	0.526	0.337	0.526	0.189	0.0
16	0.526	0.432	0.461	0.526	0.493	0.0	0.461	0.505	0.526	0.337	0.0
17	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
18	0.526	0.503	0.526	0.337	0.397	0.526	0.100	0.505	0.189	0.525	0.521
19	0.5260	0.511	0.505	0.337	0.442	0.189	0.526	0.505	0.526	0.569	0.337
20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
21	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
22	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
H	0.260	0.234	0.193	0.222	0.226	0.117	0.143	0.218	0.152	0.191	0.109

### Heterocigosidad Observada y Esperada para el H-30.

Locus	H-30 I		H-30 P	M-27XM-28		M-27	M-28	M-29	M-29XM-30		M-30
1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	0.442	0.268	0.100	0.337	0.420	0.505	0.268	0.0	0.268	0.052	0.100
4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	0.0	0.481	0.0	0.0	0.461	0.526	0.0	0.179	0.505	0.531	0.0
6	0.0	0.304	0.395	0.395	0.479	0.526	0.337	0.0	0.179	0.0	0.0
7	0.0	0.230	0.526	0.100	0.230	0.0	0.395	0.0	0.0	0.230	0.395
8	0.526	0.442	0.337	0.442	0.505	0.442	0.189	0.0	0.0	0.0	0.0
9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
11	0.526	0.526	0.526	0.100	0.526	0.526	0.526	0.526	0.526	0.526	0.526
12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
13	0.0	0.397	0.526	0.0	0.521	0.521	0.521	0.179	0.526	0.103	0.0
14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
15	0.337	0.505	0.526	0.526	0.526	0.526	0.526	0.505	0.526	0.442	0.0
16	0.526	0.397	0.100	0.0	0.479	0.526	0.337	0.442	0.479	0.268	0.0
17	0.0	0.0	0.0	0.100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
18	0.526	0.515	0.100	0.526	0.521	0.5085	0.526	0.526	0.337	0.505	0.442
19	0.526	0.472	0.337	0.526	0.461	0.189	0.505	0.526	0.526	0.515	0.479
20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
21	0.0	0.0	0.100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.521	0.0	0.0
22	0.0	0.027	0.0	0.0	0.052	0.0	0.100	0.0	0.0	0.0	0.0
H	0.155	0.207	0.162	0.139	0.235	0.218	0.192	0.131	0.200	0.144	0.088

## VI. CONCLUSIONES

De los resultados anteriores se concluye que el mejor método para medir la distancia genética como resultado de análisis de zimogramas por isoenzimas es la Distancia Genética de Nei para un pequeño número de individuos. El uso de esta técnica es recomendable cuando el tamaño de muestra sea de 10 individuos o menos, siempre y cuando se obtenga la resolución para el mayor número de loci posibles, por lo menos 20.

Aunque existen diferencias significativas entre los híbridos dobles con distintas procedencias en cuanto al Índice de Diversidad Genética, el valor de éste es alto en relación con líneas más avanzadas y sus híbridos, lo cual es de esperarse pues es la característica que se busca al crear los híbridos dobles.

Las diferencias entre los híbridos dobles de distintas procedencias se debe al manejo que se le da a cada uno en las dos instituciones (INIFAP y PRONASE), ya que la presión selectiva introducida por el fitomejorador no es homogénea en ambas.

El Híbrido doble que más se aleja de lo esperado es el H-30 de PRONASE; el H-28I, H-28P y H-30I se comportan dentro de lo esperado.

El Número Total de Alelos, la Riqueza de Alelos y el Número de Loci Polimórficos son parámetros que dan idea de la diversidad genética; sin embargo, no son definitivos. En este sentido resulta más efectivo el Índice de Diversidad Genética, que se complementa perfectamente con la Distancia Genética de Nei para un pequeño número de individuos y con la Distancia de Rogers si el número de individuos es mayor.

## VII. APENDICE A

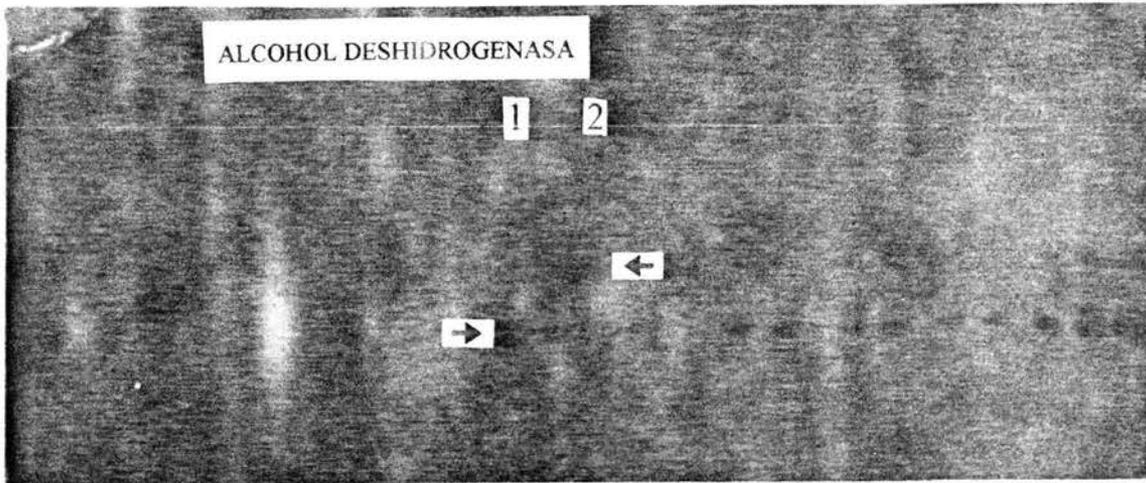


Fig. 1. Zimograma que muestra las bandas representativas de la enzima Alcohol Deshidrogenasa (ADH). Las bandas señaladas se describen abajo.

Línea 1: Homodímero Adh2-1.

Línea 2: Homodímero Adh1-4.

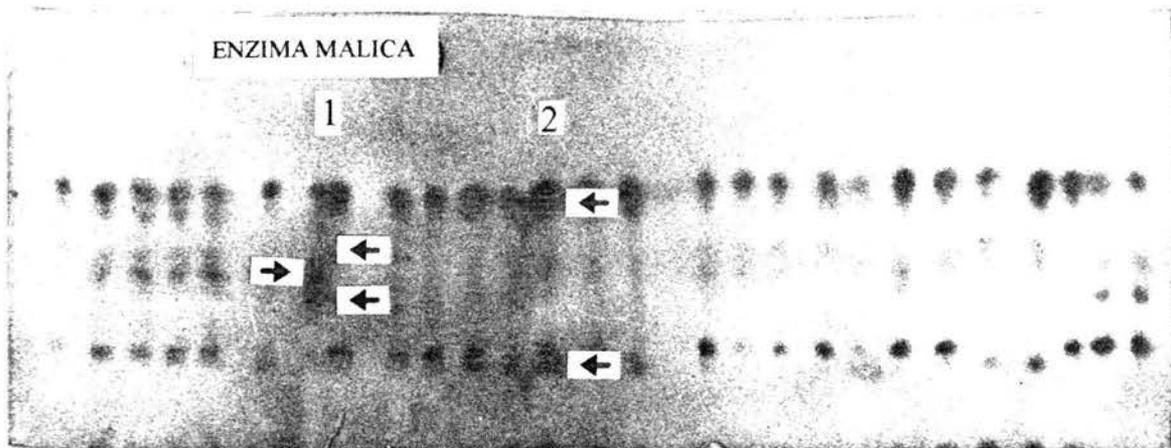


Fig. 2. Zimograma que muestra las bandas representativas de la Enzima Mállica (ME). Las bandas señaladas se describen abajo.

Línea 1: Las flechas de arriba a abajo señalan: Homodímero Me2-1, Heterodímero Me2-1 / Me2-2, Homodímero Me2-2.

Línea 2. Las flechas de arriba a abajo señalan: Homodímero Me1-1, Homodímero Me3-1.

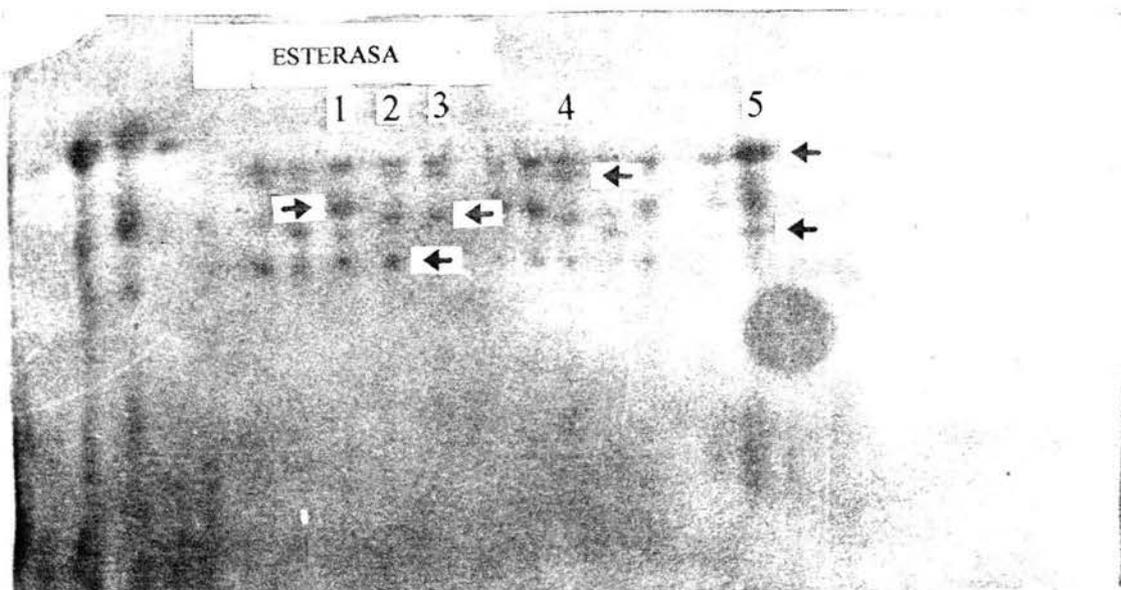


Fig.3 Zimograma que muestra las bandas representativas de la enzima Esterasa (EST). Las bandas señaladas se describen abajo:

- Línea 1: Homodímero E8-2.
- Línea 2: Homodímero E6-1.
- Línea 3: Homodímero E7-1.
- Línea 4: Homodímero E8-1.
- Línea 5: Las flechas de arriba a abajo señalan: Homodímero E9-1, Homodímero E7-2.

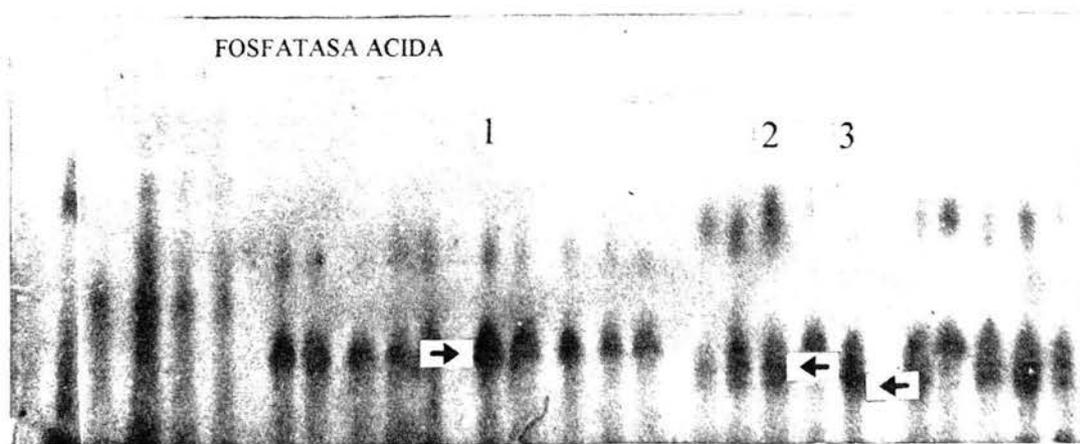


Fig.4. Zimograma que muestra las bandas representativas de la enzima Fosfatasa Acida (ACP). Las bandas señaladas se describen abajo.

- Línea 1: Homodímero Acp1-6.
- Línea 2: Heterodímero Acp1-6 / Acp1-3.
- Línea 3: Homodímero Acp1-3.



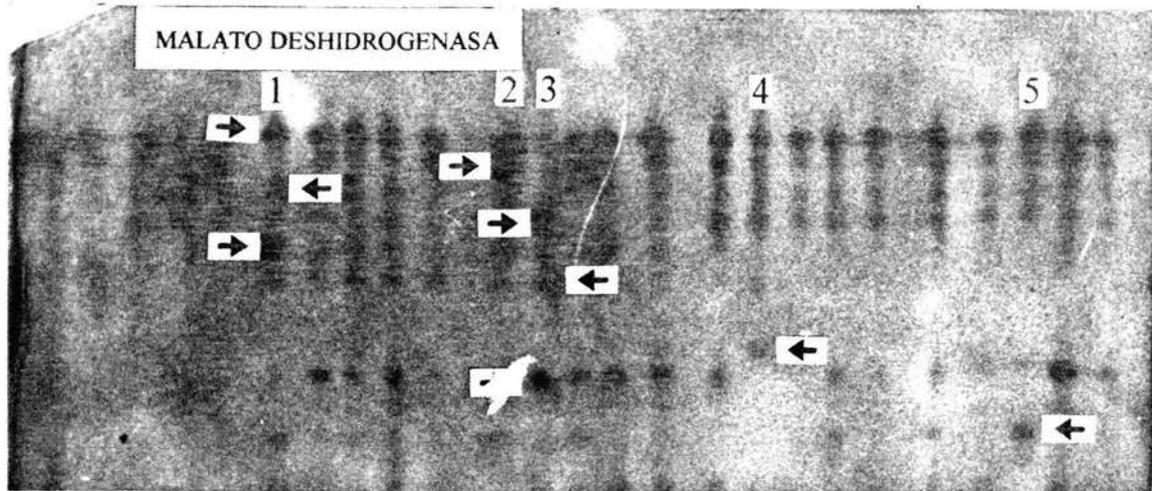


Fig. 7. Zimograma que muestra las bandas representativas de la enzima Malato Deshidrogenasa (MDH). Las bandas señaladas se describen abajo.

- Línea 1: Las flechas de arriba a abajo señalan: Homodímeros comigrantes Mdh4-12 y Mdh5-12, Homodímero Mdh2-3, Heterodímero Mdh2-3 / Mdh1-6.
- Línea 2: Heterodímeros comigrantes Mdh2-3 / Mdh4-12 y Mdh2-3 / Mdh5-12.
- Línea 3: Las flechas de arriba a abajo señalan: Heterodímero Mdh1-6 / Mdh5-15, Homodímeros comigrantes Mdh1-6 y Mdh2-6, Heterodímero Mdh1-1 / Mdh1-6.
- Línea 4: Heterodímero Mdh1-1 / Mdh1-6 cuando el alelo mmm-1 se encuentra en estado homocigótico.
- Línea 5: Homodímero Mdh1-1.

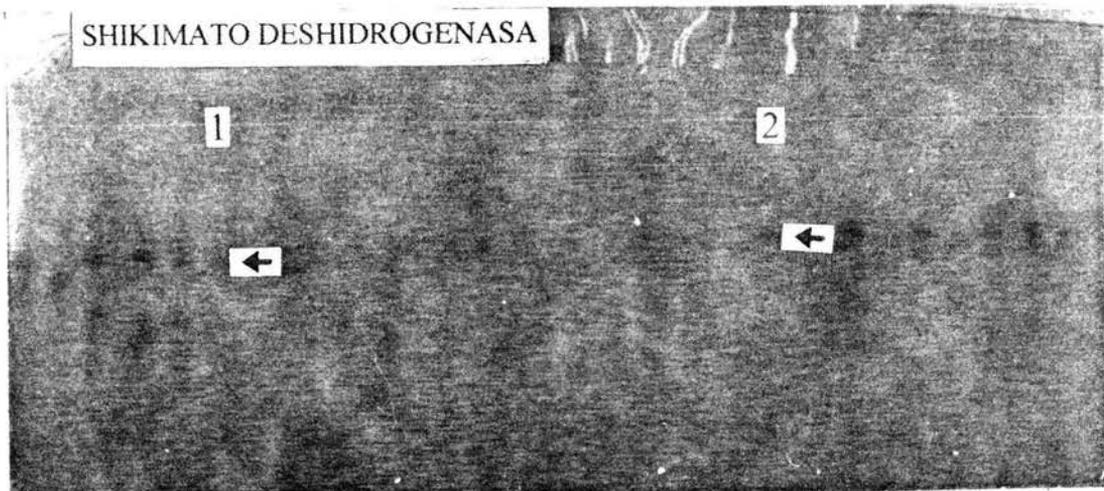


Fig.8. Zimograma que muestra las bandas representativas de la enzima Shikimato Deshidrogenasa (SAD). Las bandas señaladas se describen abajo.

- Línea 1: Homodímero Sad1-4.
- Línea 2: Homodímero Sad1-2.

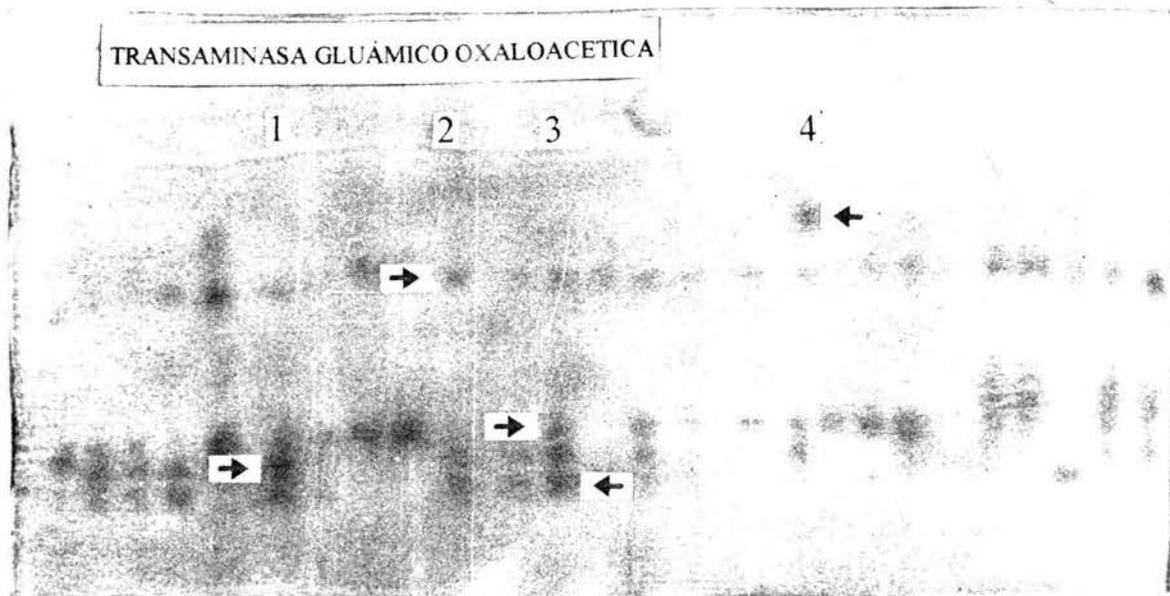


Fig.9. Zimograma que muestra las bandas representativas de la enzima Transaminasa Glutámico Oxaloacética (GOT). Las bandas señaladas se describen abajo.

- Línea 1: Heterodímero Got1-4 / Got1-6.
- Línea 2: Homodímero Got2-4.
- Línea 3: Las flechas de arriba a abajo señalan: Homodímero Got1-4, Homodímero Got1-6.
- Línea 4: Homodímero Got3-4.

## VIII. APENDICE B

<b>8.1. Buffer de Extracción</b>	
REACTIVO	CONCENTRACION
Tris-HCl pH 7.5	0.5 M
Sacarosa	16.0 %
Ac. Ascórbico, sal Disódica	8.0 %
Polivinilpirrolidona (PVP 40)	8.0 %
Metasulfito de Sodio	0.5 %
Mercaptoetanol	0.11% (v/v)

<b>8.2. Fórmulas Para la Preparación de Geles</b>	
TIPO DE GEL	REACTIVOS
<b>Gel C</b>	42.25 gr de almidón hidrolizado. 14.15 gr de sacarosa. 315 ml de buffer tris-cítrico pH 8.3. 35 ml de buffer electrodo C.
<b>Gel D</b>	61.75 gr de almidón hidrolizado. 14.25 gr de sacarosa. 375 ml de agua destilada. 125 ml de buffer electrodo D.

### 8.3. Fórmulas Para Buffers de Gel y de Electroodos.

GEL	BUFFER ELECTRODO	BUFFER GEL
C	11.875 gr/l Acido Bórico Ajustar a pH 8.3 con Hidróxido de Litio.	9 partes de buffer Tris-cítrico (6.2 gr/l de Trizma base ajustar a pH 8.3 Acido cítrico). 1 parte de buffer electrodo C.
D	10.088 gr L-histidina Ajustar a pH 6.5 con Acido Cítrico.	Dilución 1:3 del buffer electrodo D.

### 8.4. Fórmulas para el revelado.

#### 8.4.1. ACP (FOSFATASA ACIDA).

50 ml buffer Ac.Acético-Acetato de Sodio 0.1M pH 5.0  
50 mg Fast Garnet GBC salt \*  
50 mg MgCl<sub>2</sub> \*  
50 mg de Fosfato Acido de  $\alpha$ -Naftilo ( $\alpha$ -NAP)\*

#### 8.4.2. ADH (ALCOHOL DESHIDROGENASA).

50 ml buffer Tris-HCl 0.05M pH 8.0

1 ml Alcohol Etilico al 95%

20 mg B-NAD \*

20 mg MTT \*

5 mg PMS \*

#### 8.4.3. EST (ESTERASA)

50 ml buffer de fosfato Assay ph 6.0

50 mg Fast Blue RR Salt \*

20 mg  $\beta$ -Naftil Acetato + \*\*

20 mg  $\alpha$ -Naftil Acetato ° \*\*

\* Agitar durante 5 minutos

\*\* Agregar justo antes de revelar

+ Solución en acetona

° Solución en acetona al 50%

#### 8.4.4. GOT (TRANSAMINASA GLUTAMICO OXALOACETICA)

50 ml Solución de Sustrato \*\* \*

50 mg Fast Blue BB Salt \*

\* Usar inmediatamente después de mezclar

##### **\*\* Solución de Sustrato pH 7.4**

146.1 mg Acido  $\alpha$ -Ketoglutarico

532.24 mg Acido L-Aspartico

2 gr PVP-40

200 mg EDTA

5.68 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro

400 ml H<sub>2</sub>O

Almacenar en refrigeración por no más de cuatro semanas.

#### 8.4.5. MDH (MALATO DESHIDROGENASA)

50 ml Buffer Tris-HCl 0.1M pH 9.1

100 mg Acido Málico Neutralizado \*

20 mg NAD \*

10 mg NBT \*

1.25 mg PMS \*

#### 8.4.6. ME (ENZIMA MALICA)

50 ML buffer Tris-HCl 0.1M pH 8.5

50 mg Acido Málico Neutralizado \*

50 mg MgCl<sub>2</sub> \*

15 mg NADP \*

10 mg NBT \*

1 mg PMS \*

#### 8.4.7. 6-PGD ( 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA )

50 ml Buffer Tris-HCl 0.05M pH 8.0

20 mg Acido 6-Fosfogluconico sal trisódica \*

50 mg MgCl<sub>2</sub> \*

5 mg NADP \*

5 mg MTT \*

1.5 mg PMS \*

#### 8.4.8. PGM (FOSFOGLUCOMUTASA)

50 ml Buffer Tris-HCl 0.1M pH 8.5

250 mg  $\alpha$ -D-Glucosa-1-Fosfato, sal disódica

100 mg MgCl<sub>2</sub> \*

10 mg B-NAD \*

7.5 mg MTT \*

1 mg PMS \*

37.5u Glucosa-6-Fosfato-Deshidrogenasa \*

#### 8.4.9. PHI ( FOSFOHEXOSA ISOMERASA )

50 ml Buffer Tris-HCl 0.05M pH 8.0

50 mg D-Fructosa-6-Fosfato \*

50 mg MgCl<sub>2</sub> \*

5 mg NADP \*

5 mg MTT \*

1.5 mg PMS

10u Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa \*

#### 8.4.10. SAD (SHIKIMATO DESHIDROGENASA)

60 ml Buffer Tris-HCl 0.1M pH 9.1

60 mg Acido Shikímico \*

10 mg NADP \*

5 mg MTT \*

1.5 mg PMS \*

**\* Agregar justo antes de revelar.**

### 8.5. Soluciones Stock para revelado

SOLUCIÓN	REACTIVO	CONCENTRACIÓN (Mg/ml)	VOL
BB	Fast Blue BB Salt	100	30
GBC	Fast Garnet GBC Salt	50	40
F-6-P	Fructosa-6-Fosfato, sal disódica	50	20
G-6-PDH	Glucosa-6-Fosfato Des- hidrogenasa NADP	50 u/ml	100
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio	100	100
MA	Acido DL-Málico	50	100
MTT	Azul de Tiazolil Tetrazolio	10	60
α-NA	Ó-Naftil acetato	20	50
β-NA	β-Naftil acetato	20	50
β-NAD	β-Nicotinamida adenina dinucleótido	20	100
β-NADP	β-Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	10	Lo necesario para 1 ó 2semanas
NBT	Nitro blue tetrazolium	10	100
PMS	Fenazín Metosulfato	5	100
6-PGA	Acido-6-Fosfogluónico, sal trisódica	20	50
NAP	Fosfato ácido de α-naftilo, sal disódica	100	50
FIX	Solución de Fijador (Acido acético glacial:metanol:agua 1:5:5 en volúmen)		1000

### 8.6. Buffers para revelado (Preparación)

ISOENZIMA	BUFFER	pH	REACTIVOS
ADH	Assay	8.0	6.05 gr/l Trizma base.
PHI/6-PGD			Ajustar a pH 8.0 con HCl
ACP	Assay	5.0	13.6 gr/l Acetato de Sodio. Ajustar a pH 5 con HCl.
EST	Stock A	4.46	27.8 gr/l Fosfato de Monobásico de Sodio.
	Stock B	9.1	53.6 gr/l Fosfato Dibásico de Sodio.
	Assay	6.0	5(stock A):1(stock B):4 H <sub>2</sub> O.
PGM	Assay	8.5	Ajustar a pH 8.5 con HCl.
ME			
MDH	Assay	9.1	12.1 gr/l Trizma base.
SAD			Ajustar a pH 9.1 con HCl

### 8.7. Equipo de laboratorio

Taladro de 1200 r.p.m.	Máquina para hielo frappé
Micropipetas de 20,200 y 1000 $\mu$ l.	Centrífuga refrigerada de 6000 r.p.m. a $-20^{\circ}\text{C}$ .
Gradillas de unicel para 100 microtubos.	Ultracongelador a $-80^{\circ}\text{C}$ .
Refrigerador con congelador a $-20^{\circ}\text{C}$ .	Agitador orbital
2 fuentes de poder de 500 V	2 cubas para electroforesis
2 tablas para cortar geles	1 arco cortador
Potenciómetro	Agitador magnético
Cámara fría	Balanza analítica
Balanza semianalítica	Balanza Semianalítica
Incubadora a $36^{\circ}\text{C}$	Horno de microondas
Bomba de vacío	Campana de flujo laminar
Autoclave	15 recipientes para revelado
2 moldes para geles C	2 moldes para geles D

## IX. BIBLIOGRAFIA

- Barber, H.N., Driscoll, C.J., Long, P.M., y Vickery, R.S. 1969. Gene similarity of the triticinae and the study of segmental interchanges. *Nature*, 222:897-898.
- Barber, H.N., Driscoll, C.J., Long, P.M., y Vickery, R.S. 1968. Protein genetics of wheat and homologous relationship of Chromosomes. *Nature*, 218:450-452.
- Bergman, J.W., y Maan, S.S. 1973. Genetic control of isozymes in wheat-rye addition lines with rye or wheat cytoplasm. Proc. 4th Intern. Wheat Genet. Symp. pp. 329-336.
- Bhatia, D.R., y Smith, H.H. 1966. Variation associated with a *Aegilops umbellulata* chromosome segment incorporated in wheat. *Nature*, 211:1425-1426.
- Cardy, J.B., y Kannenberg, W.L. 1982. Allozymic variability among maize inbred lines and hybrids: Applications for cultivar identification. *Crop Science*. Vol 22:1016-1020
- Bretting, P.K., Goodman, M.M., Stuber, C.W. Isozymatic variation in Guatemalan races of maize. *Amer. J. Bot.* 77(2): 211-225.

- Chao, S.E., y Scandalios, J.G. 1971. Alpha-amylase of maize: differential allelic expression at the Amy-1 gene locus, and some physiochemical properties of the isozymes. *Genetics*, 69:47-61.
- Colgan, D.J. 1992. Interspecific isozymic substitution is not random. *Heredity* 69: 150-159.
- Doebley, J.F., Goodman, M.M., y Stuber, C.W. 1985. Isozyme variation in the races of maize from Mexico. *Amer. J. Bot.* 72(5):629-639.
- Edwards, M.D., Helentjaris, T., Wright, S., Stuber, C.W. 1992. Molecular-marker facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. 4. Analysis based on genome saturation with isozyme and restriction fragment length polymorphism markers. *Theor. Appl. Genet.* 83:765-774.
- Farkas, G.L. y Stahmann, M. A. 1966. On the nature of changes in peroxidase isoenzymes in bean leaves infected southern bean mosaic virus. *Phytopathology*, 56:669-671.
- Ferl, R.J., Newton, K.J., y Schwartz, D. 1983. Comparison of electrophoretic mobilities of maize Alcohol Dehydrogenase and Malate Dehydrogenase allozymes under native condition and in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Maydica*.

- Freeling, M. y Schwartz, D. 1973. Genetic relationships between the multiple alcohol dehydrogenase of maize. *Biochem. Genet.* 8:27-36.
- Freeling, M., y Bennet, D.C. 1985. Maize Adh1. *Ann. Rev. Genet.* 1985. 19:297-323.
- Frei, O.M., Stuber, C.W., y Goodman, M.M. 1986. Use of Allozymes as genetic markers for predicting performance in maize single cross hybrids. *Crop Science*. Vol 26, 37-42
- Gerdes, J.T., Tracy, W.F. 1994. Diversity of historically important sweet corn inbreds as estimated by RFLP's, Morphology, Isozymes, and Pedigree. *Crop. Sci.* 34:26-33
- Goodman, M.M. y Stuber, C.W. 1982. Further variation encountered for Mmm. *Maize. Genet. Coop. Newsl.* 56:126-127
- Goodman, M.M., Stuber, C.W., Lee, C-N., y Johnson, F.M. 1980. Genetic control of Malate Dehydrogenase isozymes in maize. *Genetics* 94:153-168.
- Goodman, M.M., Stuber, C.W., Newton, K., y Weissinger, H.H. 1980. Linkage relationships of 19 enzyme loci in maize. *Genetics* 96:697-710

- Hadjinov, M.I., Scherback, U.S., Benko, N.I., Gusev, V.P., Sukhorzhevskaya, T.B., y Voronova, L.P. 1982. Interrelationships between isozymic diversity and combining ability in maize lines. *Maydica* XXVII:135-149.
- Hunter, R.L., y Markert, C.L. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, 125:1294-129.
- Hart, G.E., McMillin, D.E., Sears, E.R. 1976. Determination of the chromosomal location of a glutamate oxaloacetate transaminase structural gene using *Triticum-Agropyron* translocations. *Genetics* 83:49-61.
- Irani, B.N., y Bhatia, C.R. 1972. Chromosomal location of Alcohol Dehydrogenase gene(s) in rye, using wheat-rye addition lines. *Genetics*, 45:195-200.
- Jacobsen, J.V., Scandalios, J.G., y Varner, J.E. 1970. Multiple forms of amylase induced by gibberellic acid in isolated barley aleurone layers. *Plant. Physiol.*, 45:367-371.
- Kephart, S.R. 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *Amer. J. Bot.* 77(5):693-712.
- Llauradó, M., Moreno-González, J., Arús, P. 1993. Classification of northern Spanish population of maize by methods of numerical taxonomy. II. Isozyme variation. *Maydica* 38:249-258

- MacDonald, T. y Smith, H.H. 1972. Variation associated with an Aegilops umbellulata chromosome segment incorporated in wheat. II. Peroxidase and leucine aminopeptidase isozymes. *Genetics*, 72:77-86.
- Markert, C.L., y Moller, F. 1959. Multiple forms of enzyme: tissue ontogenic and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 45:753-763.
- Miernyk, J.A. 1992. Purification and characterization of the major Acid Phosphatase isozyme secreted by maize endosperm cultures. *Phytochemistry* 31(8):2613-2616.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*. Vol. 106, No. 949.
- Nei, M. 1978. Estimation of heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Ockerse, R., Siegel B.Z., y Galston, A.W. 1966. Hormone induced repression of a peroxidase isozyme in plant tissue. *Science* 151:452-453.
- Pollack, L.M., y Gardner, C.O. 1986. Relationships between heterozygous enzyme loci and plant traits in two open-pollinate maize populations. *Maydica* XXXI:203-213.

- Rogers, J.S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in Genetics VII. Univ. of Texas Bull.* 7213:145-153.
- Salanoubat, M., y Pernes, J. 1986. Enzyme polimorphisms within and between european maize population. *Maydica XXXI*:269- 278.
- Scandalios, J.G. 1964. Tissue specific isozyme variation in maize. *J. Hered.* 55:281-285.
- Scandalios, J.G. 1966. Amylase isozyme polimorphism in maize. *Planta* 69:244-248.
- Scandalios, J.G., 1967. Genetic control of alcohol dehydrogenase isozymes in maize. *Biochem. Genet.* 1:1-9.
- Scandalios, J.G., Sorenson, J.C., y Ott, L.A. 1975. Genetic control and intracellular location of glutamate oxaloacetic transaminase in maize. *Biochem. Genet.* 13:759-769.
- Shepard, K.W. 1968. Chromosomal control of endosperm protein in wheat and rye. *Proc. 3rd. Intern. Wheat Genet. Symp.* 86-96.

Skibinski, D.O.F., Woodwark, M., Ward, R.D. 1993. A quantitative test of the Neutral Theory using pooled allozyme data. *Genetics* 135:233-248.

Smith, J.S.C., Goodman, M.M., y Stuber, C.W. 1985. Genetic variability within U.S. maize germoplasm. II. Widely-used inbred lines 1970 to 1979. *Crop Science*, Vol. 25, 681-685.

Smith, O.S., Smith, J.S.C. 1992. Measurement of Genetic Diversity among maize hybrids; a comparison of Isozymic, RFLP, Pedigree and Heterosis data. *Maydica* 37:53-60.

Smithies, O. 1955. Zone Electrophoresis in Starch Gels. *Biochem. J.* 61:629.

Soltis, D.E., Soltis, P.S. 1989. Isozymes in Plant Biology. *Advances in Plant Sciences Series, Volume 4.* Dioscorides Press; Portland, Oregon. 268 pp.

Stuber, C.W., Wendel, J.F., Goodman, M.M., y Smith, J.S.C. 1988. Techniques and scoring procedures for Starch Gel Electrophoresis of enzyme from maize (*Zea mays* L.). Technical Bulletin No. 286. North Carolina State University, 87 pp.

Stuber, W.C., y Moll, H.R. 1972. Frequency changes of isozymes alleles in a selection experiment for grain yield in maize (*Zea mays* L). *Crop Science*, Vol. 12:337-340.

Varner, J.E., y Chandra, G.R. 1964. Hormonal Control of enzyme synthesis in barley endosperm. Proc. Natl. Acad. Sci. 52:100-106.

Ward, B.W. 1994. Allozymes in evolutionary genetics: Self-imposed burden or extraordinary tool ? Genetics 136:11-16.