



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL



Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral
Regional

Variabilidad genética del género Zea
TESIS

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias en
Gestión Ambiental

PRESENTA

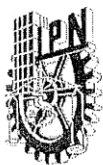
Diana María Rivera Rodríguez

DIRECTORES DE TESIS

Dra. Norma Almaraz Abarca

Dr. José de Jesús Sánchez González

Durango, Dgo. Noviembre de 2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 13:00 horas del día 20 del mes de Noviembre del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN DGO para examinar la tesis titulada:
Variabilidad genética del género Zea.

Presentada por la alumna:

RIVERA

RODRÍGUEZ

DIANA MARÍA

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

B	1	0	1	0	8	4
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN GESTIÓN AMBIENTAL

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Norma Almaraz Abarca

Dr. José de Jesús Sánchez

M. en C. Néstor Naranjo Jiménez

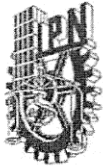
Dra. Yolanda Herrera Arrieta

M. en C. Eli Aránzada Delgado Alvarado

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. José Antonio Avila Reyes

DISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 20 de Noviembre del 2012

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Durango en su sesión ordinaria No. 12 celebrada el día 7 del mes de Diciembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

RIVERA

RODRÍGUEZ

DIANA MARÍA

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre (s)

Con registro:

B	1	0	1	0	8	4
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Maestría en Ciencias en Gestión Ambiental

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
"Variabilidad genética del género Zea"

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dra. Norma Almaraz Abarca y Dr. José de Jesús Sánchez

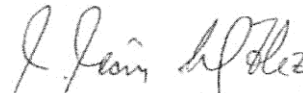
3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
CIIDIR-IPN Unidad Durango
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis



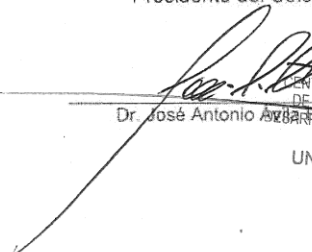
Dra. Norma Almaraz Abarca
Aspirante



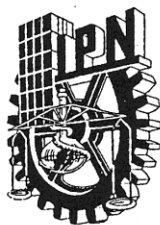
Dr. José de Jesús Sánchez
Presidente del Colegio



Ing. Diana María Rivera Rodríguez



Dr. José Antonio Abarca
CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **DURANGO, DGO.**, el día **20** del mes de **NOVIEMBRE** del año **2012**, la que suscribe **DIANA MARÍA RIVERA RODRÍGUEZ** alumna del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN GESTIÓN AMBIENTAL** con número de registro **B101084** adscrita a **CIIDIR-IPN UNIDAD DURANGO**, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **DRA. NORMA ALMARAZ ABARCA** y del **DR. JOSÉ DE JESÚS SÁNCHEZ** y cede los derechos del trabajo intitulado **VARIABILIDAD GENÉTICA DEL GÉNERO *Zea***, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección dinaris@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

DIANA MARÍA RIVERA RODRÍGUEZ

Nombre y firma

AGREDECIMIENTOS

Agradezco principalmente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado una beca para cursar mis estudios de Maestría y por el apoyo económico brindado para realizar una estancia de investigación en Granada, España.

Al CIIDIR IPN Unidad Durango por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

A la Dra. Norma Almaraz por su amistad y apoyo durante estos dos años y su asesoramiento para poder concluir este trabajo.

Al Dr. José de Jesús Sánchez Gonzales por sus importantes comentarios para poder mejorar este trabajo y por haber brindado las semillas para poder llevar a cabo esta tesis.

A M.C. Natividad Uribe por prestarme las instalaciones del invernadero para poder llevar a cabo mi trabajo de investigación.

Al Dr. Antonio Segura Carretero y el Dr. David Arraez Román por abrirme las puertas para poder realizar mi estancia de investigación en su laboratorio del CIDAF de la Universidad de Granada, España ya que parte del trabajo experimental de esta tesis se llevo a cabo en su centro.

A todo el equipo de investigación del CIDAF por su apoyo y amistad brindado durante ese tiempo en especial a Patricia García, Celia, Cecilia, Nassima, Arantza, Ameni y Hakim ya que hicieron mi estancia más placentera.

A Laura Ticó, por su valiosa amistad y apoyo durante toda la maestría y por todos los momentos compartidos es estos años.

A mi comité revisor Dra. Yolanda, M.C. Néstor Naranjo y M.C. Amanda Delgado

A toda las personas que estuvieron siempre apoyándome para poder concluir esta tesis muchas gracias.

El cultivo del material vegetal y los análisis moleculares del presente trabajo se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología y en el Invernadero del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Durango del Instituto Politécnico Nacional, con la dirección de la Dra. Norma Almaraz Abarca y el Dr. José de Jesús Sánchez González. Los análisis químicos se realizaron en el Laboratorio del Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional (CIDAF) de la Universidad de Granada, España, con la orientación del Dr. David Arraez Román y el Dr. Antonio Segura Carretero.

ÍNDICE

GLOSARIO.....	i
ABREVIATURAS Y ACRONIMOS	ii
RELACIÓN DE FIGURAS	iii
RELACIÓN DE TABLAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	3
1.1 Aspectos históricos	3
1.2 Aspectos biológicos del género <i>Zea</i>	3
1.2.1 Descripción morfológica.....	5
1.2.2 Taxonomía del género <i>Zea</i>	7
1.2.3 Distribución geográfica del teocintle	10
1.3 Marcadores moleculares	11
1.3.1 RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs, por sus siglas en inglés).....	12
1.3.2 Estudios moleculares del género <i>Zea</i>	12
1.4 Marcadores químicos	16
1.4.1 Flavonoides	19
1.4.2 Estudios sobre la composición fenólica del género <i>Zea</i>	22
II. JUSTIFICACIÓN	25
III. OBJETIVO.....	26
IV. METODOLOGÍA	27

4.1. Material vegetal.....	27
4.2 Caracterización molecular.....	29
4.2.1 Extracción de ADN.....	29
4.2.2 Amplificación de marcadores RAPD	29
4.3 Caracterización química.....	30
4.3.1 Extracción de fenoles de polen.....	30
4.3. 2 Extracción de fenoles foliares	30
4.3.3 Análisis de UPLC-MS (TOF).....	31
4.4 Análisis de datos.....	31
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
5.1 Análisis molecular	33
5.2 Perfiles fenólicos de polen	40
5.3 Perfiles fenólicos de hoja	49
VI. CONCLUSIONES	64
VII. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS.....	66
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
IX. ANEXOS	81
Anexo 1. Cromatogramas	79

GLOSARIO

Abscisión	Proceso por el cual se separan de una planta las hojas, los pétalos y los frutos
Apoptosis	Serie de eventos genéticamente programados que conducen a la muerte celular.
Electroforesis	Técnica de separación en la cual las moléculas como proteínas, ADN o ARN se separan entre sí por su carga eléctrica y peso molecular.
Especie	Es un grupo o población natural de individuos que pueden cruzarse entre sí, pero que están aislados reproductivamente de otros grupos afines.
Espectro	Distribución de la intensidad de una radiación en función de una magnitud característica, como la longitud de onda, la energía, la frecuencia o la masa.
Introgresión	Movimiento de genes de una especie a otra a consecuencia de un proceso de hibridación interespecífica seguido de retrocruzamiento
Subespecie	Cada uno de los grupos que se dividen las especies y que se componen de individuos que además de los caracteres propios de las misma, tienen en común otros caracteres morfológicos por los cuales se asemejan entre si y se distinguen de las demás subespecies.
Verticilo	Más de dos órganos que nacen de un mismo punto

ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

A ₂₆₀	Absorbancia a 260 nm
A ₂₈₀	Absorbancia a 280 nm
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CIDAF	Centro de Investigación del Alimento Funcional (Granada, España)
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, por sus siglas en Ingles
CUCBA	Centro Universitario de Ciencias Biologicas y Agropecuarias
ESI	Ionización por electrospray
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MS	Espectrometría de masas
PAST	Palaeontological Statistics, por sus siglas en ingles
PCR	Polimerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
ppm	Partes por millón
RAPDs	Random Amplified Polymorphic DNAs, por sus siglas en inglés
TOF	Tiempo de vuelo
t _R	Tiempo de retención
UGR	Universidad de Granada
µL	Microlitro
µm	Micra
UPLC	Ultra performance Liquid chromatography
v/v	Relación volumen/volumen

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Teocintle mostrando una inflorescencia femenina	4
Figura 2. Diferencias morfológicas entre maíz y teocintle, este último se distingue del primero por sus ramificaciones laterales y las numerosas inflorescencias femeninas pequeñas (Tomado de Doebley, 2003).....	6
Figura 3. Diferencias más notables entre el teocintle y el maíz con relación a la inflorescencia femenina. El raquis (RA) y la gluma (OG) forman la capsula que rodea la semilla (Tomado de Doebley, 2003).....	7
Figura 4. Distribución natural de las especies silvestres del género <i>Zea</i>	11
Figura 5. Estructura química básica de los flavonoides	19
Figura 6. Patrones de amplificación utilizando el iniciador OPA20	33
Figura 7. Dendograma generado a partir de la combinación de los dos marcadores RAPDs	39
Figura 8. Cromatograma de la población 694 donde se muestran los seis compuestos más importantes encontrados en el polen de todas las poblaciones analizadas de <i>Zea</i> . 4: Quercetina-3-O-glucosido-7-O-glucosido, 6: Quercetina-3-soforosido-7-glucosido, 8: Quercetina-3,3'-O-diglucosido, 9: Isoramnetina-3-O-gentiobiosido, 10: Quercetina rutinosido, 13: Quercetina-3-galactosido.....	40
Figura 9. Agrupamiento de las diferentes poblaciones de <i>Zea</i> , de acuerdo a los perfiles fenólicos de polen (B= raza Balsas, MC= raza Mese Central, Ch= raza Chalco, N= raza Nabogame, lu= <i>Z. luxurians</i> , di= <i>Z. diploperennis</i> , pe= <i>Z. perennis</i>).48	
Figura 10. Cromatograma correspondiente al tejido foliar de la población 694 (<i>Zea perennis</i>), en el que se muestran los ocho compuestos principales encontrados en tejido foliar de todas las poblaciones. 1: Ácido cloragénico, 10: Canferol 3-O- β -rutinosido, 33: Maisina, 40: Diosmetina 7-O-ramnosil (1 \rightarrow 6)-glucosido, 50: Teaflavina, 52: Tricina 4'-O-(eritro- β -guaicilgliceril)ether, 53: 3'5'-O-Dimetiltricetina, 55: Epicatequina 3-O-galato	49
Figura 11. Agrupamiento de las diferentes poblaciones de <i>Zea</i> de acuerdo a sus perfiles fenólicos foliares (B= raza Balsas, MC= raza Mese Central, Ch= raza Chalco, N= raza Nabogame, lu= <i>Z. luxurians</i> , di= <i>Z. diploperennis</i> , pe= <i>Z. perennis</i>).	61

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía del género <i>Zea</i> propuesta por varios autores	9
Tabla 2. Clasificación de las familias de compuestos fenólicos, de acuerdo a su tamaño y estructura molecular	17
Tabla 3. Clasificación de los Flavonoides	20
Tabla 4. Origen geográfico de las especies y poblaciones de <i>Zea</i> analizadas	27
Tabla 5. Secuencia de los iniciadores RAPD utilizados en el presente trabajo.....	29
Tabla 6. Porcentaje de polimorfismo, diversidad genética e índice de Shannon detectado con dos marcadores de iniciadores RAPDs en 36 poblaciones teocintle .	34
Tabla 7. Compuestos encontrados en polen con UPLC-MS (TOF).....	41
Tabla 8. Compuestos encontrados en tejido foliar por UPLC-MS (TOF).....	50

RESUMEN

En este trabajo se determinó la variabilidad genética mediante dos marcadores moleculares RAPD, de 36 poblaciones silvestres del género *Zea*. La composición fenólica del polen se determinó para 17 de esas poblaciones, y la composición fenólica foliar para 16 de ellas. Los perfiles de amplificación generaron 47 loci, todos polimórficos. El polimorfismo, el índice de diversidad genética de Nei, y el índice de diversidad de Shannon revelaron una baja variabilidad intrapoblacional comparada con otros trabajos. El dendograma generado por un análisis de agrupamiento no mostró una clara separación de las dos secciones en las que ha sido dividido el género, ni la separación de las especies y subespecies reconocidas en él por varios autores, lo que sugiere que esos dos marcadores permiten amplificar secuencias conservadas en los genomas de los diferentes taxa de *Zea*. Los compuestos fenólicos de polen y de tejido foliar fueron determinados por UPLC-MS (TOF). Un total de diecinueve compuestos fenólicos se encontraron en el polen, de los cuales, 15 fueron derivados glicosidos de flavonoles, entre ellos destacan los derivados de quercetina e isoramnetina. Quercetina-3-3'-O-diglicosido fue el compuesto principal, encontrado en mayor cantidad en el polen de todas las muestras analizadas. La tendencia de acumulación de los compuestos fenólicos fue muy similar en todas las muestras de polen. El análisis fenético de los perfiles fenólicos del polen tampoco mostro una clara separación de las dos secciones, ni de las especies y subespecies reconocidas actualmente para el género *Zea*. El tejido foliar de las poblaciones presentó una mayor diversidad química que el polen, un total de 55 compuestos fueron encontrados, de los que destacan los derivados glicosidos de flavonas. Entre los componentes foliares resaltan la maisina y el ácido cloragénico, compuestos importantes por su toxicidad a insectos plaga del maíz. Por tener mayor variabilidad, el análisis fenético de los perfiles de hoja permitió discriminar entre *Z. mays* ssp. *mexicana* y *Z. mays* ssp. *parviglumis*; la pertenencia de *Z. luxurians* a la sección *Luxuriantes*, no fue sustentada, como tampoco lo fue con los perfiles fenólicos de polen ni con los marcadores RAPD.

Palabras clave: Teocintle, *Zea*, RAPD, perfiles fenólicos, variabilidad

ABSTRACT

In this study the genetic variability, assessed by RAPD molecular markers, of 36 wild populations of the genus *Zea* was determined. The phenolic composition of pollen for 17 of these populations and the foliar phenolic composition for 16 of them were also determined. Forty seven loci, all polymorphic, were amplified from the RAPD markers. Polymorphism, genetic diversity index of Nei, and Shannon diversity index revealed a low variability within populations compared to the other reports. The dendrogram generated by a cluster analysis did not show a clear separation of the two sections in which the genus *Zea* has been divided neither the separation of species and subspecies recognized in the genus by several authors, suggesting that those markers allow amplifying conserved regions in the genomes of the different taxa of *Zea*. The phenolic compounds of pollen and leaf tissue were determined by UPLC-MS (TOF). A total of nineteen phenolic compounds were found in pollen, of which 15 were glycoside derivatives of flavonols, among them the quercetin and isorhamnetin derivatives were the most relevant. Quercetin-3-3'-O-diglycoside was the major compound; it was accumulated at the highest level in the pollen of all samples tested. The tendency of accumulation of phenolic compounds was very similar in all samples of pollen. Phenetic analyses of pollen phenolic profiles did not either show a clear separation of the two sections, neither of the currently recognized species and subspecies of the genus *Zea*. The foliar tissue showed a higher chemical diversity than that of pollen, a total of 55 compounds was found, highlighting the glycoside flavones derivatives. Among the foliar components highlights the maysin and chlorogenic acid, both important compounds for their toxicity to insect pest of corn. By having greater variability, phenetic analysis of leaf profiles allowed discrimination between *Z. mays* ssp. *mexicana* and *Z. mays* ssp. *parviglumis*, but the inclusion of *Z. luxurians* to *Luxuriantes* section was not supported, as was not either by the phenolic profiles of pollen and by RAPD markers.

Key words: Teosinte, *Zea*, RAPDS, phenolic profiles, variability

INTRODUCCIÓN

Una de las características más importantes de la diversidad vegetal en México es que el 12% de los géneros y entre el 50 y 60% de todas las especies son endémicas; este es el caso de algunas especies de teocintle (*Zea ssp.*).

El termino teocintle, se usa para designar de manera conjunta a los parientes silvestres de maíz, los cuales están representados por especies y subespecies anuales, perennes diploides y tetraploides, distribuidas a lo largo del territorio nacional y en menos proporción en Guatemala, Honduras y Nicaragua.

Los teocintles (*Zea ssp.*), son gramíneas altamente emparentadas con el maíz, que debido a la poca información sobre su utilidad agrícola y ganadera, cambios en el uso del suelo y modernización de la agricultura, existen algunas especies que están en peligro de extinción.

De los diversos estudios realizados para explicar la participación del teocintle en el origen del maíz, se ha concluido que la especie de teocintle más cercana al maíz es *Zea mays ssp. parviglumis*, a la que pertenece la raza Balsas y dentro de esta raza las poblaciones que más han participado en el origen del maíz fueron las ubicadas en los estados de Michoacán, México y Guerrero (Matsuoka *et al.*,2002, Doebley, 2004).

La caracterización de parientes silvestres de especies cultivadas, como el maíz, en términos químicos, bioquímicos, y genéticos, es de relevancia porque se genera información que puede ser útil para la domesticación y aprovechamiento de los primeros y para realizar mejoramiento genético de las segundas.

Diferentes marcadores además de los morfológicos, han sido utilizados para abordar problemáticas taxonómicas en diversos grupos de plantas, entre ellos se encuentran los caracteres químicos y moleculares.

Los perfiles de flavonoides son considerados marcadores quimiotaxonómicos valiosos a nivel específico, sin embargo, no habían sido revisados en la mayoría de los teocintles, únicamente, algunas variedades de maíz y un teocintle anual se han estudiado con fines de búsqueda de compuestos con actividad biológica.

Ambos tipos de marcadores fueron utilizados en el presente estudio. Este trabajo se realizó con el objetivo de determinar la capacidad de los marcadores RAPD, y de los

perfiles fenólicos foliares y del polen para estimar la variabilidad genética de poblaciones silvestres del género *Zea*.

Para la realización de este trabajo se llevo a cabo una revisión de literatura sobre el género *Zea* y los trabajos que se han llevado a cabo con respecto a análisis moleculares y de compuestos fenólicos en el género, esto se presenta en el capítulo I. La justificación y el objetivo que rigieron la presente investigación se presentan en los capítulos II y III. La descripción de los métodos utilizados para cumplir con el objetivo y cómo se procesaron los datos generados se presenta en el capítulo IV. Los resultados de cada uno de los métodos utilizados se presentan de manera individual junto con su discusión en el capítulo V. Para finalizar este trabajo se presentan las conclusiones generales en el capítulo VI, y las recomendaciones y/o sugerencias que se pueden realizar en investigaciones futuras, siguiendo con estas mismas metodologías se presentan en el capítulo VII.

I. ANTECEDENTES

1.1 Aspectos históricos

Todas las plantas domesticadas han sido un factor importante en la economía de las diversas culturas del mundo; han sido y siguen siendo usadas como alimento, bebida, medicina, y como materiales para la industria. En México, el proceso de domesticación del maíz se inició hace aproximadamente 10 000 años, tiempo en el que casi todas las plantas de cultivo fueron domesticados (Doebley, 2004). Esa especie de cereal tuvo un papel central en el origen y la difusión de la agricultura en todas las civilizaciones indígenas de Mesoamérica, que dependieron en gran medida del maíz. La gran variedad de metates, comales, instrumentos de cultivo y cerámica utilizados para su producción y procesamiento han demostrado su importancia. Así mismo, las ceremonias religiosas, registradas en documentos históricos y que aún se realizan en nuestros días en algunas regiones de México; las historias y leyendas sobre el origen del maíz y del hombre; y los cientos de usos del grano y otras partes de la planta, ilustran su importancia en las culturas antiguas y actuales de México y del resto de Latinoamérica (Sánchez, 2011).

En México se concentra la mayor diversidad de maíz del mundo, fue aquí donde se llevó a cabo el proceso de su domesticación, y en su territorio aun se encuentran los parientes silvestres de ese importante cereal, los llamados teocintles.

1.2 Aspectos biológicos del género *Zea*

El maíz y el teocintle (Figura 1) pertenecen a la tribu Andropogoneae, subtribu Tripsacinae, familia Poaceae, género *Zea* (Sánchez *et al.*, 2011). No existe consenso en el número de géneros comprendidos en esa familia. Rzedowski y Rzedowski (2001) mencionan 600, y Takhtajan (2009) reporta entre 670 y 850, con 10500 a 11000 especies.

El género *Zea*, al cual pertenecen el maíz y los teocintles, comprende dos secciones, la sección *Luxuriantes* y la sección *Zea*. De acuerdo a Sánchez *et al.* (2011), dentro de la sección *Luxuriantes* se reconocen cuatro especies: *Zea diploperennis* Iltis, Doebley y Guzmán; *Zea perennis* (Hitchcock) Reeves & Mangelsdorf; *Zea luxurians* (Durieu y Ascherson) Bird; y la descrita en el año 2000 *Zea nicaranguensis* Iltis &

Benz. La sección *Zea* comprende una especie, *Zea mays*, la cual contiene cuatro subespecies: *Zea mays* ssp. *mexicana*, *Zea mays* ssp. *huehuetenangensis*, *Zea mays* ssp. *parviglumis*, y *Zea mays* ssp. *mays*. Dentro de *Zea mays* ssp. *mexicana* se reconocen cuatro razas: Raza Chalco, Raza Mesa Central, Raza Durango, y Raza Nobogame. Dentro de *Zea mays* ssp. *parviglumis* se reconoce la Raza Balsas. *Zea mays* ssp. *mays* corresponde al maíz (especie cultivada del género), los otros taxa son conocidos colectivamente como teocintle.



Figura 1. Teocintle mostrando una inflorescencia femenina

Los parientes silvestres del maíz o teocintles están representados por especies anuales y perennes diploides y por una especie tetraploide, *Zea perennis*. Los teocintles son plantas rústicas que aún se encuentran en varias localidades en México. En ocasiones son reconocidos como malas hierbas o maleza, pero en muchos lugares son fuente alterna de alimento para el ganado cuando escasea el forraje (Sánchez y Ruiz, 1996).

Debido a la poca información sobre su utilidad agrícola y ganadera, algunas especies de teocintle (*Zea* ssp) están en peligro de extinción. De manera general, al teocintle se le ha atribuido una gran influencia en el incremento de la variación y la formación de las principales variedades de maíz en México (Wellhausen *et al.*, 1951;

Mangelsdorf y Reeves, 1959; Mangelsdorf, 1974, 1986; Wilkes, 1979), debido entre otras cosas al sistema de reproducción que permite la hibridación natural en ambos sentidos permitiendo un constante flujo de genes (Wilkes, 1970, 1977; Benz *et al.*, 1990). Sin embargo, otros investigadores consideran que no ha habido introgresión entre maíz y teocintle en ambos sentidos (Kato, 1984), o que ésta es muy reducida (Doebley, 1990; Kato, 1996), o bien que la hibridación e introgresión en el género no han sido eventos comunes (Ross-Ibarra *et al.*, 2009), porque no han sido favorecidos por los patrones actuales de distribución geográfica, donde muchas poblaciones no se encuentran en forma simpátrica (Sánchez *et al.*, 2011). No se sabe con precisión hasta qué punto el teocintle ha participado en la formación de las razas de maíz.

Además de la importancia del teocintle en la evolución del maíz, se le ha considerado desde el siglo pasado, como una especie de gran potencial forrajero en la alimentación animal para las regiones tropicales y subtropicales con base en estudios de calidad y potencial de rendimiento y a sus mecanismos de dispersión y establecimiento; adicionalmente, se considera un germoplasma valioso para el mejoramiento del maíz, especialmente en lo que respecta a resistencia a enfermedades y factores adversos (Sánchez *et al.*, 1998)

El estudio del teocintle genera conocimiento para abordar aspectos de la genética del maíz, lo que es importante para el fitomejoramiento de ese cultivo, y para esclarecer aspectos evolutivos de ese importante cereal. Estudiar la naturaleza y la variabilidad presente en los teocintles incrementará el conocimiento de los recursos genéticos y fundamentará la creación de estrategias y metodologías para el aprovechamiento y conservación del maíz.

1.2.1 Descripción morfológica

De acuerdo a Doebley (2003), los teocintles son plantas herbáceas con hábitos perennes y anuales, de tallos erectos ramificados, de elevada longitud, alcanzando alturas de dos a seis metros. Presentan un aspecto exterior similar al del maíz en su morfología general sobre todo en los órganos vegetativos (tallo y hojas), y en la espiga terminal. En la madurez, los teocintles se distinguen fácilmente del maíz porque en los primeros, se desarrolla una espiga masculina en el extremo de cada

rama lateral y numerosas inflorescencias femeninas pequeñas, características que el maíz no posee (Figura 2).

La estructura que diferencia al teocintle del maíz, es la inflorescencia femenina que en el maíz es una mazorca polística (varias hileras de granos) con la semilla desnuda, en cambio el teocintle presenta mazorcas dísticas (dos hileras) con la semilla protegida por un segmento duro del raquis (Figura 3).

En el teocintle, la gluma exterior es dura y junto con el raquis forma la cápsula que rodea la semilla. Sin embargo, este raquis se rompe con facilidad después de la madurez de la semilla (Figura 3). Ésta es una capacidad de dispersión de las semillas que el maíz perdió durante el proceso de domesticación y que distingue al teocintle como pariente silvestre. En el maíz las semillas ya no pueden dispersarse sin la ayuda del hombre. La espiga o inflorescencia masculina también se desarticula por el desarrollo de un tejido de abscisión. Otros rasgos que separan al teocintle y al maíz son el número pequeño de semillas producidas en cada espiga femenina (5 a 11) en el primero, y el gran número de espigas agrupadas en un fascículo, que en el maíz no se presenta (Kato *et al.*, 2009).

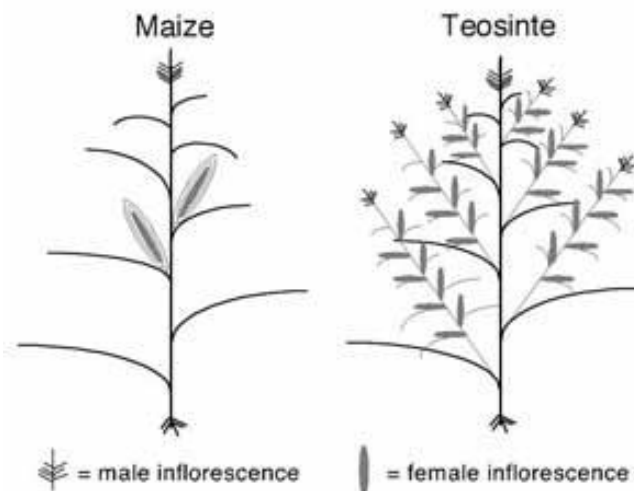


Figura 2. Diferencias morfológicas entre maíz y teocintle, este último se distingue del primero por sus ramificaciones laterales y las numerosas inflorescencias femeninas pequeñas (Tomado de Doebley, 2003)

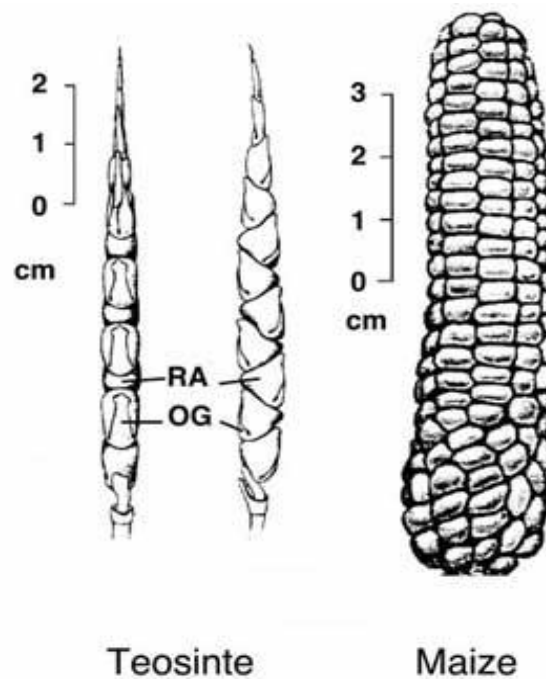


Figura 3. Diferencias más notables entre el teocinte y el maíz con relación a la inflorescencia femenina. El raquis (RA) y la gluma (OG) forman la capsula que rodea la semilla (Tomado de Doebley, 2003)

I.2.2 Taxonomía del género *Zea*

En la actualidad no existe un consenso en la clasificación taxonómica de los teocintles. La delimitación específica y la ubicación de especies en un sistema de clasificación de este grupo de plantas han variado a lo largo del tiempo. En los estudios de Wilkes (1967) se reconocieron y describieron cuatro razas de teocinte para México: Nobogame, Mesa Central, Chalco y Balsas, y dos para Guatemala: Guatemala y Huehuetenango.

Doebley e Iltis (1980) e Iltis y Doebley (1980) realizaron estudios basados en caracteres morfológicos de la inflorescencia masculina, bajo la suposición de que dicha estructura no ha estado sujeta a la presión selectiva del hombre, como lo ha sido la inflorescencia femenina. Con los resultados de sus estudios, basados en evidencias citológicas, propusieron una nueva división del género *Zea* que incluyó dos secciones: la sección *Luxuriantes* en que se incluyó a *Zea perennis*, *Zea diploperennis*, y *Zea luxurians*; y la sección *Zea* que incluyó a *Zea mays* dividida en

dos subespecies, *Zea mays* ssp. *mexicana*, para las razas de teocintle Chalco, Mesa Central y Nobogame; *Zea mays* ssp. *parviglumis* que incluyó las razas Balsas y Huehuetenango, y *Zea mays* ssp. *mays* para el maíz cultivado.

El descubrimiento de nuevas poblaciones con características morfológicas propias y las evidencias moleculares reveladas de taxa previamente estudiados por sus características morfológicas, ha llevado a modificar la clasificación de Doebley e Iltis (1980) e Iltis y Doebley (1980). De acuerdo a Sánchez *et al.* (2011) el género *Zea* pertenece a la familia Poaceae, de la subtribu Tripsacinae, de la tribu Andropogoneae. El género está dividido en dos secciones, la sección *Luxuriantes* y la sección *Zea*. La sección *Luxuriantes* comprende cuatro especies, *Zea diploperennis*, *Zea perennis*, *Zea luxurians*, y *Zea nicaraguensis*. La sección *Zea* está formada también por cuatro especies, *Zea mays* ssp. *mexicana*, *Zea mays* ssp. *huehuetenengensis*, *Zea mays* ssp. *parviglumis*, y *Zea mays* ssp. *mays*. Para *Zea mays* ssp. *mexicana* se reconocen cuatro razas, Chalco, Mesa Central, Durango, y Nobogame; *Zea mays* ssp. *parviglumis* continúa llamándose raza Balsas; y *Zea mays* ssp. *mays* comprende al maíz cultivado. En la Tabla 1 se muestra la taxonomía del género *Zea* propuesta por varios autores.

Tabla 1. Taxonomía del género *Zea* propuesta por varios autores

Wilkes (1967; 2004)	Doebley(1990); Iltis y Benz (2000)	Sánchez et al. (2011)
Sección: <i>Euchlaena</i> (Schrader) Kuntze	Sección: <i>Zea</i>	Sección: <i>Zea</i>
<i>Zea mexicana</i> (Schrader)Kuntze		<i>Zea mays</i> L. subsp. <i>mexicana</i> (Schrader) Iltis
Chalco	<i>Zea mays</i> L. ssp. <i>mexicana</i> (Schrader) Iltis	Raza Chalco
Mesa Central	<i>Zea mays</i> L. ssp. <i>mexicana</i> (Schrader) Iltis	Raza Mesa Central
Nobogame	<i>Zea mays</i> L. ssp. <i>mexicana</i> (Schrader) Iltis	Raza Durango
Balsas	<i>Zea mays</i> L. ssp. <i>parviglumis</i> Iltis &Doebley	Raza Nobogame
Huehuetenango	<i>Zea mays</i> L. ssp. <i>huehuetenangensis</i> (Iltis & Doebley) Doebley	<i>Zea mays</i> ssp. <i>parviglumis</i> Raza Balsas
		<i>Zea mays</i> L. ssp. <i>huehuetenangensis</i> (Iltis & Doebley) Doebley Raza Huehuetenango
Sección: <i>Luxuriantes</i> (Durieu)	Sección: <i>Luxuriantes</i>	Sección: <i>Luxuriantes</i>
Guatemala	<i>Zea luxurians</i> (Durieu & Ascherson) Bird	<i>Zea diploperennis</i> Iltis, Doebley & Guzman
<i>Zea perennis</i> (Hitch.) Reeves & Mangelsdorf	<i>Zea perennis</i> (Hitch.) Reeves & Mangelsdorf	<i>Zea perennis</i> (Hitch.) Reeves & Mangelsdorf
<i>Zea diploperennis</i> Iltis, Doebley & Guzmán	<i>Zea diploperennis</i> Iltis, Doebley & Guzmán	<i>Zea luxurians</i> (Durieu & Ascherson) Bird
	<i>Zea nicaraguensis</i> Iltis & Benz	<i>Zea nicaraguensis</i> Iltis & Benz
Maíz		
Sección: <i>Mays</i> L.	Sección: <i>Zea</i>	
<i>Zea mays</i> L.	<i>Zea mays</i> L. ssp. <i>mays</i> Iltis & Doebley	<i>Zea mays</i> ssp. <i>mays</i>

Los caracteres que han sido utilizados para la elaboración de las diferentes clasificaciones taxonómicas del teocintle han sido básicamente morfológicos (Iltis y Doebley, 1980). Sin embargo, los trabajos de Doebley (1990a y 1990b) también han hecho importantes contribuciones de carácter molecular y bioquímico para la clasificación de *Zea*. Al presente se cuenta con una gama muy amplia de marcadores moleculares y nuevas técnicas y métodos que permiten analizar o emplear caracteres diferentes en estudios taxonómicos, entre ellos están los atributos químicos.

I.2.3 Distribución geográfica del teocintle

La distribución del teocintle se encuentra limitada a áreas tropicales y subtropicales de México, Guatemala, Honduras, y Nicaragua; en su mayoría como poblaciones aisladas de tamaños variables ocupando superficies de una hectárea hasta varios kilómetros cuadrados (De La Cruz, 2007). En México se extiende desde la porción sur de la región cultural conocida como Aridoamérica, en la Sierra Madre Occidental del estado de Chihuahua y el Valle del Guadiana en Durango, hasta la frontera con Guatemala incluyendo prácticamente toda la porción occidental de Mesoamérica (Sánchez y Ruiz., 1996). En las diferentes regiones de México existen poblaciones de teocintle con características morfológicas y genéticas que permiten su diferenciación (Sánchez *et al.*, 2011).

De acuerdo a Sánchez *et al.* (1998), las áreas de mayor importancia, para el teocintle son: 1) el Valle de Nabogame, en la Sierra Madre Occidental, al sur del estado de Chihuahua, donde crece la raza Nobogame; 2) el Valle del Guadiana, al este y noroeste (distante entre 8 y 20 km) de la ciudad de Durango, donde crece la raza Durango; 3) El Bajío que comprende porciones importantes de los estados de Guanajuato y Michoacán, en altitudes de 1700 a 2300 m, sobre todo en los alrededores de los lagos de Cuitzeo y Pátzcuaro, donde se encuentra la raza Mesa Central y; 4) El Valle de México, incluyendo el Distrito Federal, Chalco-Amecameca y Toluca en el estado de México, Cercanías de Ciudad Serdán y Puebla, en el estado de Puebla, donde se encuentra la raza Chalco. El área geográfica donde se distribuye principalmente *Zea mays* ssp. *parviglumis* (también llamada raza Balsas)

ocupa la superficie más grande e incluye el Occidente de México, sobre todo las áreas tropicales y subtropicales de los estados de Jalisco, Colima, Nayarit, y Michoacán, y la cuenca del Balsas, incluyendo porciones importantes de la Sierra Madre del Sur, desde Jalisco hasta Oaxaca. La Figura 4 muestra la distribución natural de las especies silvestres del género *Zea*.

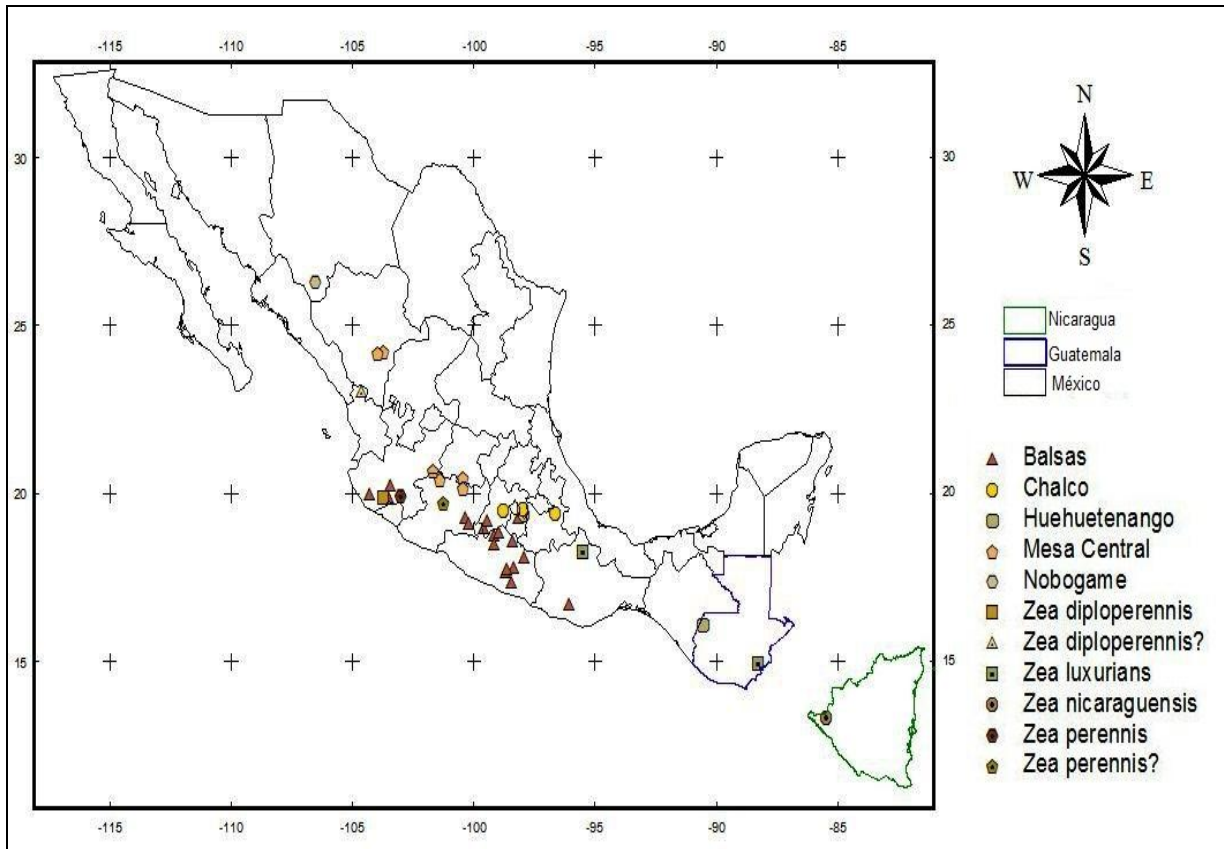


Figura 4. Distribución natural de las especies silvestres del género *Zea*

1.3 Marcadores moleculares

La biotecnología ha generado técnicas que pueden resultar importantes para el estudio, conocimiento, y conservación del teocintle. Entre éstas técnicas destaca la gran variedad de marcadores moleculares.

La diversidad que puede encontrarse en los organismos vivos, referida como biodiversidad, es esencial para mantener la permanencia de las especies en un ambiente dado y para proveer de materia prima a la agricultura, biotecnología y

medicina. La conservación de los recursos, así como su utilización, requiere de la documentación de la variación existente. Los marcadores moleculares proporcionan datos útiles para ese conocimiento, ya que permiten detectar la variación entre individuos, poblaciones, y especies directamente a nivel del material genético, es decir en el ADN (Karp, 2000).

1.3.1 RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs, por sus siglas en inglés)

Los RAPDs (llamados en español polimorfismo de ADN amplificado al azar) son marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN en una gran variedad de especies. Los RAPDs se basan en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios a un oligonucleótido de 10 pares de bases, a lo largo del genoma. El polimorfismo del tamaño de los loci, bandas, o fragmentos amplificados de ADN, encontrado entre los diferentes individuos analizados se debe a cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento de los oligonucleótidos, y a inserciones o eliminaciones de bases en esos sitios (Renteria., 2007).

1.3.2 Estudios moleculares del género *Zea*

Debido a la importancia económica, cultural, e histórica del género *Zea*, sus diferentes especies han sido ampliamente estudiadas desde el punto de vista molecular. Uno de los primeros estudios de este tipo relacionado al género *Zea* es el de Timothy *et al.* (1979). Esos autores evaluaron la variabilidad de los patrones de restricción con endonucleasas de los genomas organelares para evaluar aspectos evolutivos y taxonómicos del género. Sus resultados revelaron una cercanía genética entre las razas Balsas, Huehuetenengo, Mesa Central, y Chalco, y una cercanía menos acentuada entre todas las anteriores y la raza Nobogame (la cual fue más cercana al maíz); y una separación marcada de la raza Guatemala y el teocintle perenne (estas dos últimas como un grupo), de las cuatro primeras razas. La ausencia de diferencias en los perfiles de restricción del ADN mitocondrial entre las razas Huehuetenengo, Balsas, Mesa Central, y Chalco indicó un ancestro materno común para esas razas; y las similitudes entre la raza Guatemala y el

teocintle perenne, sugirieron que éstos han permanecido genéticamente aislados de los otros.

La variabilidad de los patrones de restricción con endonucleasas del genoma mitocondrial fue posteriormente determinado para 39 razas de maíz por Weissinger *et al.* (1983). Con base en los perfiles de restricción de ese genoma organelar, y en sí o no esos organelos contenían DNA de plásmidos, esos autores distinguieron 18 grupos de maíz, separando las razas Mesoamericanas, Sudamericanas con afinidad Mesoamericana, y Sudamericana, lo cual concordó con las afinidades raciales basadas en morfología.

Un análisis de los estudios moleculares de los genomas extracromosomales de *Zea*, realizado por Doebley (1990) puso de manifiesto el intercambio genético en ambas direcciones entre maíz y teocintle, resaltando el riesgo de que genomas genéticamente modificados de maíz puedan esparcirse entre las poblaciones de teocintle.

Buckler y Holtsford (1996) con base en la diversidad de secuencias de espaciadores de transcritos internos (ITS) ribosomales colocaron a *Zea mays* ssp. *huehuetenangensis* como basal a otras especies de *Zea mays*, y establecieron que la diversificación del maíz de sus dos parientes silvestres más cercanos (*Z. mays* ssp. *mexicana* y *Z. mays* ssp. *parviglumis*) es contemporánea. Esos autores además reconocieron la ocurrencia de introgresión de *Zea mays* en *Zea perennis* y *Zea diploperennis*.

Tiffin y Gaut (2001) apoyaron el origen contemporáneo autotetraploide de *Zea perennis* a partir de *Zea diploperennis*, con base en resultados de diversidad de secuencias de cuatro loci nucleares.

Matsuoka *et al.* (2002) evaluaron el valor de microsatélites desarrollados para maíz en estudios evolutivos de *Zea*. Reportaron que esos marcadores detectaron una importante variabilidad dentro de poblaciones y son adecuados para determinar la variación intraespecífica y para realizar estudios evolutivos de *Zea*. Esos marcadores revelaron la división de las líneas de maíz en tropicales y templados, lo que estuvo de acuerdo con los pedigrís correspondientes previamente conocidos.

Los microsatélites también fueron usados por Fukunga *et al.* (2005) para genotipificar poblaciones de *Zea mays* ssp. *mexicana*, *Zea mays* ssp. *parviglumis*, *Zea mays* ssp. *huehuetenangensis*, *Zea luxurians*, *Z. diploperennis*, y *Zea perennis*. Sus resultados establecieron relaciones filogenéticas que fueron consistentes con las establecidas previamente por otros autores, como Doebley *et al.* (1987), quienes basándose en datos de DNA del cloroplasto (cpDNA) reconocieron la división basal del género *Zea* en las dos secciones conocidas y reconocen la cercana relación entre *Zea luxurians* con *Zea perennis* y *Zea diploperennis*. Sin embargo Buckler y Holtsford (1996), quienes se basaron en la diversidad de ITS ribosomales, y Tiffin y Gaut (2001), con datos sobre diversidad de secuencias de cuatro loci nucleares de *Zea perennis* y *Zea diploperennis* no apoyan la división del género en las dos secciones conocidas. Fukunga *et al.* (2005) también detectaron híbridos entre *Zea mays* ssp. *parviglumis* y *Zea mays* ssp. *mexicana* y confirmaron la introgresión a un nivel bajo entre teocintle y maíz, previamente sugerida por Doebley (1990), la cual fue más común entre las razas de *Zea mays* ssp. *mexicana*. Con evidencias filogeográficas y filogenéticas, esos autores proponen que *Zea mays* ssp. *parviglumis* diversificó en la parte este de su distribución, ampliando ésta desde el este hacia el oeste, y que *Zea mays* ssp. *mexicana* diversificó en la Mesa Central de México, y amplió su distribución por diferentes rutas, al norte y al este.

La clonación y secuenciación de genes de interés también ha sido realizado, principalmente para maíz de uso en forraje. Andersen *et al.* (2007) estudiaron desde esos puntos de vista un locus de la secuencia genómica de PAL, la enzima fenilalanina amonioliasa, que es una enzima clave en la biosíntesis de los fenoles vegetales, porque cataliza el inicio de la ruta, al desaminar la L-fenilalanina a ácido cinámico. Sus resultados mostraron baja diversidad nucleotídica entre 32 líneas de maíz, posiblemente resultado de la selección de esas líneas para aumentar la digestibilidad de la pared celular, la cual está asociada a la cantidad y estructura de la lignina.

El locus ácido caféico-O-metiltransferasa también ha sido estudiado en maíz utilizado para forraje por su relación con la digestibilidad de la pared celular, al estar esa enzima involucrada en la metilación de los precursores de la lignina. Contrario al

caso de PAL (Andersen *et al.*, 2007), los autores de este trabajo, Zein *et al.*, (2007), encontraron alta diversidad y el polimorfismo detectado permitió identificar haplotipos, considerados valiosos para la búsqueda de alelos de interés para mejorar la calidad del forraje.

El polimorfismo de nucleótido individual (SNP por sus siglas en inglés) fue utilizado por Van Heerwaarden *et al.* (2010) para determinar la estructura genética de dos poblaciones de *Zea mays ssp. parviglumis*, confirmando un nivel alto de cruzamiento y un bajo pero claro nivel de diferenciación genética entre ellas, probablemente debido a las características topográficas de los dos sitios.

El análisis de la secuencia completa de ocho genes mitocondriales de maíz y *Zea mays ssp. parviglumis*, *Zea luxurians*, y *Zea perennis* fue hecho por Darracq *et al.* (2010) para identificar los eventos que han determinado las características estructurales de ese genoma en esas especies de *Zea*, como son el orden de los genes, y los arreglos y duplicaciones de tRNAs, rRNAs, marcos de lectura abierta (ORFs), pseudogenes, y secuencias no codificantes. Sus resultados sugirieron un modelo de duplicación en tandem, similar al descrito en animales. Las relaciones filogenéticas que los autores encontraron, basada en eventos de rearrreglos y duplicaciones, fue congruente con las establecidas con el polimorfismo de secuencias.

Eschholz *et al.* (2010), con el fin de determinar las relaciones genéticas y la diversidad de razas de maíz de Suiza utilizaron microsatélites. Con base en esos marcadores, los autores encontraron dos grupos, coincidentes con las condiciones geográficas, climáticas, y culturales, uno al norte y el otro al sur de ese país. Esos autores no reportaron una asociación de los grupos formados a regiones específicas. La alta diversidad encontrada sugirió que la colección de maíz en Suiza tiene potencial para ampliar el pool genético de esa especie en Europa.

Entre los estudios más reciente se encuentra el de Sánchez *et al.* (2011), quienes analizaron 51 accesiones de especies y razas de teocintle, incluyendo tres poblaciones descubiertas en los estados mexicanos de Michoacán, Oaxaca, y Nayarit. Con resultados basados en datos citológicos, ecológicos, morfológicos, fisiológicos, y moleculares, basados estos últimos en microsatélites, esos autores

sugirieron que las poblaciones de Michoacán, que es un teocintle perenne tetraploide; la de Oaxaca, que es anual diploide; y la de Nayarit, que es perenne diploide, representan tres entidades taxonómicas distintas de la sección *Luxuriantes*, cuyo estatus específico requiere ser revisado.

La importancia de la caracterización molecular como parte de los programas de conservación, manejo, y mejoramiento de recursos vegetales, dan relevancia a estudios enfocados a la búsqueda de marcadores moleculares que revelen la variabilidad genética del teocintle y contribuyan a la determinación específica de sus elementos.

De acuerdo a la revisión de literatura realizada para llevar a cabo el presente estudio, los marcadores moleculares que han sido usados para estudios de variabilidad del género *Zea* son a) la variabilidad de los patrones de restricción con endonucleasas de genes organelares (Timothy *et al.*, 1979), b) la diversidad de secuencias de espaciadores internos (ITS) ribosomales nucleares (Buckler y Holtsford, 1996), c) microsatélites (Matsuoka *et al.*, 2002; Fukunga *et al.*, 2005), d) clonación y secuenciación de genes nucleares (Andersen *et al.*, 2007), e) polimorfismo de nucleótidos individuales (SNP) (Van Heerwaarden *et al.* (2010), f) secuenciación completa de genes mitocondriales (Weissinger *et al.*, 1983), y g) en algunas líneas de maíz, *Zea mays* subsp. *mays*, marcadores RAPDs (Pejic *et al.*, 1998). Recientemente los marcadores RAPD también se utilizaron para determinar las relaciones genéticas entre algunas especies del género *Zea* (Wang *et al.*, 2011).

1.4 Marcadores químicos

Los marcadores químicos están basados en los perfiles de los compuestos secundarios de las plantas. Éstos representan una gama muy amplia de compuestos que por no haberseles encontrado una participación directa en los procesos fundamentales de fotosíntesis, respiración, desarrollo y crecimiento se les llamo metabolitos secundarios (Kutchan, 2001).

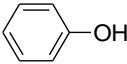

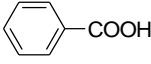
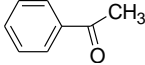
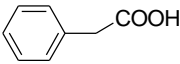
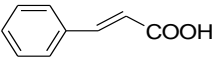
Aunque en la actualidad su apreciación ha cambiado y se les reconoce participaciones muy diversas e importantes en los procesos fisiológicos (Taiz y Zeiger, 2008) y en las relaciones ecológicas de las plantas para asegurar su

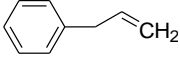
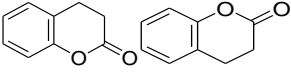
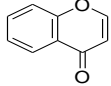
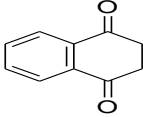
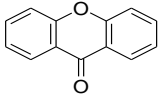
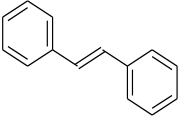
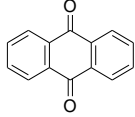
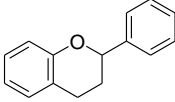
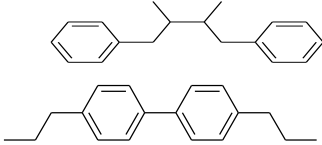
sobrevivencia (Almaraz *et al.*, 1998; Hadacek, 2002), a esos compuestos se les sigue llamando secundarios.

Los metabolitos secundarios se dividen en tres grandes grupos de acuerdo a sus rutas biosintéticas: derivados terpénicos, compuestos nitrogenados y compuestos fenólicos (Taiz y Zeiger, 2008).

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen unos de los principales grupos de metabolitos secundarios. Son un grupo muy diverso y ampliamente distribuido en el reino vegetal, con más de 8000 estructuras químicas conocidas actualmente. El grupo incluye compuestos de tamaño molecular pequeño, como los fenoles simples y benzoquinonas, de 6 átomos de carbono (C₆); de tamaño molecular medio, como los flavonoides (C₆C₃C₆); hasta grandes polímeros, como las ligninas y los taninos, de *n* número de carbonos [(C₆-C₃)*n* y (C₆-C₃-C₆)*n*, respectivamente] (Harbone, 1989). Los compuestos fenólicos se pueden dividir en al menos 10 clases diferentes dependiendo de su tamaño y estructura molecular básica (Bravo, 1998). En la Tabla 2 se indican las principales familias de compuestos fenólicos junto con su estructura básica, muchos de ellos se encuentran en la naturaleza asociados a sacáridos (glicósidos), o como derivados funcionales tales como ésteres o metilésteres.

Tabla 2. Clasificación de las familias de compuestos fenólicos, de acuerdo a su tamaño y estructura molecular

Esqueleto básico	Familia	Estructuras
C ₆	Fenoles simples	
	Benzoquinonas	
C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos	
	Acetofenonas	
C ₆ -C ₂	Ácidos fenilacéticos	
C ₆ -C ₃	Ácidos cinámicos	

	Fenilproenos	
	Cumarinas, isocumarinas	
	Cromonas	
C ₆ -C ₄	Naftoquinonas	
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas	
	Estilbenos	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Antraquinonas	
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides	
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanós, neolignanós	
(C ₆ -C ₁) _n	Taninos hidrolizables	Polímero heterogéneo formado por ácidos fenólicos y azúcares simples
(C ₆ -C ₃) _n	Ligninas	Polímero aromático altamente entrecruzado

1.4.1 Flavonoides

Dentro los fenoles, los flavonoides son compuestos con 15 átomos de carbono en su molécula, la cual está formada por dos anillos aromáticos (A y B) unidos por un anillo heterocíclico (C) (Figura 5).

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos dentro del reino vegetal y son los más abundantes, los más diversos (Markham, 1982), y los preferidos para estudios quimiotaxonomicos (Harbone y Turner, 1984; Campos, 1997; Almaraz *et al.*, 2006, Almaraz *et al.*, 2008). Algunas de las características de los perfiles fenólicos, principalmente de flavonoides, por los que son empleados en esos estudios, son las siguientes: su amplia distribución en todos los grupos de plantas; su gran variabilidad química; la relativa independencia de su síntesis y almacenamiento, con respecto a los factores ambientales; su relativa facilidad de análisis (Markham, 1982; Harborne y Turner, 1984); y su determinación genética, que está dada, en el caso de algunos flavonoides, por un solo gen (Heller y Forkmann, 1994).

Los flavonoides tienen una gama muy amplia de funciones dentro de las plantas, entre ellas, participan en la regulación del transporte de fitohormonas, en algunas especies, regulan la germinación y el crecimiento del tubo polínico, y representan mecanismos de defensa contra el ataque de herbívoros y patógenos. También desempeñan importantes papeles en las relaciones ecológicas de las plantas como atrayentes de polinizadores y dispersores de semillas, y como sustancias alelopáticas.

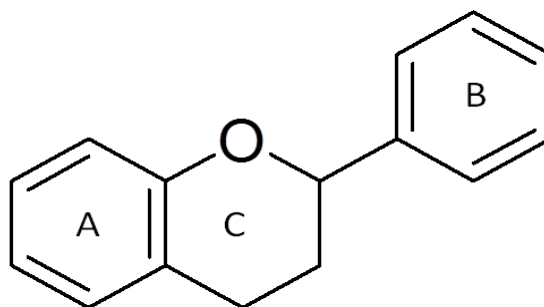
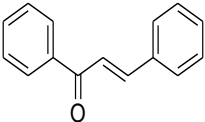
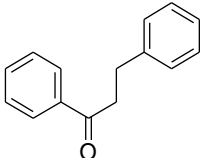
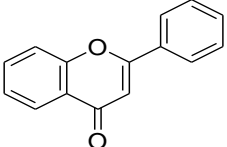
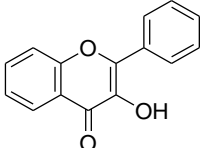
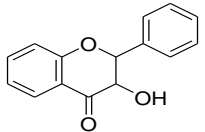
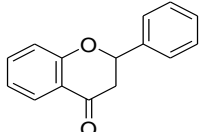


Figura 5. Estructura química básica de los flavonoides

La Tabla 3 muestra la clasificación de los flavonoides de acuerdo a sus características estructurales, relacionadas al grado de oxidación del anillo C.

Tabla 3. Clasificación de los Flavonoides

Características	Flavonoide	Estructura básica
<p>Es el primer compuesto aislable formado en la biosíntesis de flavonoides, aunque estas se pueden considerar como intermedios obligados en las vías biosintéticas, no se acumulan en un grado apreciable en la mayoría de las plantas.</p>	Chalconas	
<p>Comprenden un pequeño grupo de flavonoides en el cual la unión tres carbonos ha sido reducida por un doble enlace.</p>	Dihidrochalconas	
<p>Como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.</p>	Flavonas	
<p>Representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.</p>	Flavonoles	
<p>O, 3- hidroxiflavanona tiene una amplia distribución en el reino vegetal. Ha sido reportada en helechos, gimnospermas y algunas variedades de angiospermas. El compuesto más común de este grupo es la dihidroquercetina.</p>	Dihidroflavonoles	
<p>Son un tipo de flavonoides que carecen de un doble enlace en el anillo C.</p>	Flavanonas	

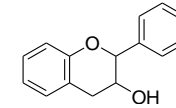
Como la catequina, con un grupo –OH en posición 3 del anillo C.

Tienen unido el grupo –OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

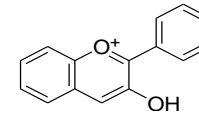
Se caracteriza por presentar una desviación del anillo B de la posición 2 a la 3. Se considera un grupo heterogéneo, ya que forma parte de él las isoflavonas, los isoflavanos y los isoflavonoides.

Son macromoléculas constituidas por unidades de flavonoides llamadas antocianidina

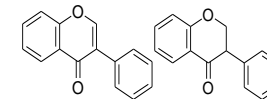
Flavanoles (catequinas)



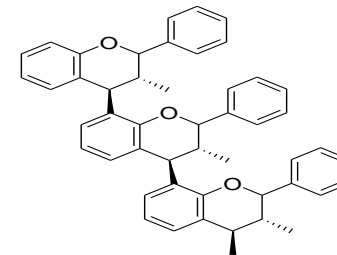
Antocianidinas



Isoflavonoides



Taninos condensados o proantocianidinas



La variedad estructural dentro de un mismo grupo de flavonoides está dada por modificaciones químicas a una estructura básica (patrones de sustitución), originadas por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación, acilación, metoxilación, y glicosilación.

La modificación de los patrones de sustitución es regulada por enzimas que catalizan reacciones de modificación de flavonoides individuales y exhiben una alta especificidad de sustrato, implicando que esas reacciones proceden en un orden secuencial definido, que se considera específico para cada especie de planta (Heller y Forkman, 1994). Esta variabilidad, que surge por los patrones de modificación genera perfiles fenólicos diferentes entre los miembros de una población y entre especies, lo cual es parte de la estrategia de adaptación de las plantas (Wink y Schimmer, 1999). La detección de esa variabilidad puede ser utilizada en estudios taxonómicos.

1.4.2 Estudios sobre la composición fenólica del género *Zea*

Las implicaciones taxonómicas de la composición fenólica del género *Zea* no han sido abordadas previamente. Algunos reportes sobre el contenido de fenoles en maíz han aparecido en artículos cuyo objetivo, aunque relacionado, no es precisamente conocer la composición de esos compuestos en los diferentes tejidos, siendo mucho menores los que incluyen a alguna otra especie del género. Entre esos reportes se mencionan los siguientes.

Ceska y Styles (1984) identificaron mono, di y tri-O-glicósidos de quercetina, de isoramnetina, de canferol como los flavonoides presentes en el polen de maíz.

La distribución de ácidos fenólicos, flavonoides, y amidas de ácidos fenólicos dentro de la estructura del grano de maíz fue determinada por Sen *et al.* (1994) con el objetivo de establecer la importancia de esos fenoles para conferir resistencia al ataque de plagas. Como un todo los fenoles se acumularon principalmente en el pericarpio y en la aleurona; individualmente, los ácidos fenólicos en el embrión, aleurona y pericarpio; los flavonoides en la aleurona, y las amidas en el embrión y la aleurona. La diferencia entre razas resistentes estuvo dada por diferencias en los

contenidos y no en los patrones de acumulación, de esos compuestos en el grano. La distribución de acumulación fue similar a la de otros cereales.

El contenido de antocianinas fue determinado por Stapleton y Walbot (1994) en líneas de maíz para evaluar el papel de esos flavonoides como protectores del daño al ADN por parte de la radiación UV.

Un estudio más revelador sobre la composición de fenoles de una especie de *Zea* es el de Sosa *et al.* (1997), quienes identificaron cinco flavonoides glucósidos en los estilos y estigmas de maíz, que fueron rutina, quercetina-3,7-O-diglucósido, quercetina-3-O-glucósido-7-O-rutinosido, quercetina-3-metil-4'-O-glucósido-7-O-diglucósido, y quercetina-3-O-glucósido-O-ramnósido, como parte de un estudio enfocado a explicar, desde un punto de vista químico, la actividad biológica como diurético y analgésico de esas estructuras reproductivas.

El contenido de antocianinas foliares de líneas isogénicas de maíz, como respuesta de adaptación a regímenes variables de radiación UV, fue monitoreado por Casati y Walbot (2003) como parte de un estudio enfocado a determinar el perfil de expresión génica en respuesta a ese tipo de radiación. Contenidos variables de fenoles en diferentes genotipos fueron detectados.

Dermastia *et al.* (2009) revelaron que el patrón de acumulación de los ácidos fenólicos y flavonoides en la capa placentó-chalazal, durante el desarrollo de la cariósida, entre otros eventos de tipo anatómico-fisiológico, es similar en maíz y en *Zea mays* subsp. *parviglumis*, acumulación que puede estar relacionada a la protección de la semilla contra el ataque microbiano. Los autores infirieron que los procesos esenciales del desarrollo aparecieron en *Zea* antes de la domesticación del maíz.

Reportes sobre el control enzimático de la síntesis de flavonoides en maíz también han sido publicados (Larson, 1989; Carey *et al.*, 2004).

La composición de antocianinas ha sido determinada para el grano de diferentes variedades de maíz morado por varios autores. Cianidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido, pelargonidina 3-glucósido, cianidina 3-(6''-maloilglucósido), peonidina 3-(6''-malonilglucósido), y pelargonidina 3-(6''-malonilglucósido) fueron reportados por Aoki *et al.* (2002), De Pascual-Teresa *et al.* (2002), Schwarz *et al.* (2003), y Montilla

et al. (2008), esos últimos autores reportan también la cianidina 3-(3'',6''-dimaloilglucósido) presente en los granos de maíz morado. Los mismos compuestos, excepto los derivados de pelargonidina, más peonidina 3-(dimaloilglucósido) fueron reportados por Fossen *et al.* (2001) en flores y hojas de maíz; el último compuesto fue reportado por esos autores como previamente no encontrado en otras plantas.

De relevancia taxonómica es la mención que hace Montilla *et al.* (2008) sobre la variabilidad de los perfiles de antocianinas del grano, entre variedades diferentes de maíz boliviano; esos mismos autores consideran al maíz como una fuente importante de flavonoides antioxidantes naturales. El maíz morado fue considerado por Aoki *et al.* (2002) y Schwarz *et al.* (2003) como fuente de colorantes para la industria de los alimentos.

Debido a la tendencia especie-específica de los perfiles fenólicos (Campos *et al.*, 2002; Almaraz-Abarca *et al.*, 2006) se considera importante evaluar su potencial para contribuir a la caracterización y ubicación específica de las poblaciones naturales de teocintle.

II. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, la pérdida de la diversidad genética del género *Zea* en México es un problema grave, causada principalmente por la influencia humana. Considerando que si los modelos actuales de producción, basados en la explotación de los recursos naturales, que dan poca importancia a su conservación, no cambian, este proceso de pérdida de diversidad podría continuar con más velocidad en un futuro. Por lo anterior los estudios enfocados a estimar la variabilidad genética, como una herramienta útil para la conservación y aprovechamiento sustentable de las diferentes especies silvestres, son de importancia, ya que además permiten conocer fuentes de alelos útiles para el mejoramiento genético de sus parientes cultivados.

Debido a la variabilidad morfológica que existe en las poblaciones silvestres de diferentes taxa del género *Zea*, se han generado controversias taxonómicas relativas a la delimitación específica, aun cuando se han logrado avances importantes en las últimas décadas respecto a la conservación y caracterización para poder ubicar esas poblaciones en un sistema de clasificación.

En un gran número de especies vegetales, los marcadores moleculares y químicos han sido considerados como herramientas valiosas para estudios taxonómicos y de variabilidad, por lo que su aplicación a diferentes poblaciones silvestres del género *Zea* se considera importante para contribuir a revelar nuevos caracteres con valor taxonómico y para estimar la variabilidad genética en ese grupo de plantas.

III. OBJETIVO

Determinar la variabilidad genética de 36 poblaciones silvestres de cinco especies del género *Zea* (*Zea perennis*, *Zea diploperennis*, *Zea luxurians*, *Zea nicaraguensis* y *Zea mays*), por medio de marcadores químicos (perfiles fenólicos polínicos y foliares determinados UPLC-MS-TOF) y marcadores moleculares (RAPDs determinados por PCR).

IV. METODOLOGÍA

4.1. Material vegetal

En el presente trabajo se analizó un total de 36 poblaciones de teocintle, que representan su distribución natural en México y Centroamérica (Figura 4). Las semillas de las diferentes especies y poblaciones fueron proporcionadas por el Banco de Germoplasma del Instituto de Manejo y Aprovechamiento de Recursos Fitogenéticos (IMAREFI) del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara. La lista de las poblaciones estudiadas y su procedencia se incluyen en la Tabla 4.

Tabla 4. Origen geográfico de las especies y poblaciones de *Zea* analizadas

N° de Ref.	SITIO DE COLECTA	MUNICIPIO	ESTADO	ESPECIE/RAZA	PAIS
201	San Lorenzo (Predio El Colomo)	Ejutla	Jalisco	Balsas	México
232	El Rodeo (Potrero La Carbonera)	Tolimán	Jalisco	Balsas	México
426	Cerro Churintzio (Carr. 37)	Churintzio	Michoacán	Mesa Central	México
447	Uriangato (salida a Yuriria, Carr. 43)	Uriangato	Guanajuato	Mesa Central	México
450	San Agustín del Maíz	Copándaro	Michoacán	Mesa Central	México
474	Amatlán de Quetzalcóatl (La Puerta)	Tepoztlán	Morelos	Balsas	México
483	San Cristobal Honduras	San Jerónimo Coatlán	Oaxaca	Balsas	México
487	Crucero Lagunitas (Los Saucitos-Tecoanapa)	Tecoanapa	Guerrero	Balsas	México
517	Puerto de la Cruz (km 119 Huetamo-Villa Madero)	Carácuaro	Michoacán	Balsas	México
546	Los Cimientos	Villa Purificación	Jalisco	Balsas	México
551	Las Joyas (Las Playas)	Cuautitlan de García Barragán	Jalisco	<i>Zea diploperennis</i>	México
607	Arroyo Tarahumares (Casa Blanca-Tarahumares)	Guadalupe y Calvo	Chihuahua	Nobogame	México
615	Chapultepec	Chapultepec	México	Chalco	México
623	Km 1 Aljojuca-Santa María Coatepec	Aljojuca	Puebla	Chalco	México
635	San Antonio Zoyatzingo	Amecameca	México	Chalco	México
638	Miraflores-La Candelaria Tlapala	Chalco	México	Chalco	México
643	Plan de los Timbres (ca. Paso Morelos Carr. GRO 1)	Huitzuc de los Figueroa	Guerrero	Balsas	México
646	Vista Hermosa (La Lobera)	Olinalá	Guerrero	Balsas	México
650	Camino Vista Hermosa-Colotilpa (Barranca La Cañada)	Quechultenango	Guerrero	Balsas	México
654	El Rincón (Rincón de la Vía)	Chilpancingo de los Bravo	Guerrero	Balsas	México

Continuación de la Tabla 4.

657	El Salado (Amate Amarillo)	Mochitlán	Guerrero	Balsas	México
661	Zacatlancillo (km 80 Carr. 51, cerro El Chivo)	Teloloapan	Guerrero	Balsas	México
666	Ixcateopan (salida a Taxco)	Ixcateopan de Cuauhtémoc	Guerrero	Balsas	México
669	Oxtotitlán (km 30 Telololapan-Apaxtla de Castrejón)	Teloloapan	Guerrero	Balsas	México
674	Huixtitla	Amatepec	México	Balsas	México
679	Km 109-110 Tejupilco-Altamirano (Cuadrilla de Leones)	Tejupilco	México	Balsas	México
684	Quenchendio	Huetamo	Michoacán	Balsas	México
685	Extremo Este Cerro Grande (San Jerónimo)	Ayotlán	Jalisco	Mesa Central	México
692	San Andrés Milpillas, "Verano" de Simón Oliveros	Huajicori	Nayarit	<i>Zea diploperennis</i>	México
694	Piedra Ancha	San Gabriel	Jalisco	<i>Zea perennis</i>	México
705	Potreo EL Tepalcate al N de San José de Tuitán	Nombre de Dios	Durango	Mesa Central	México
710	Puente Gavilanes, Km 9 Carr. A Zacatecas	Durango	Durango	Mesa Central	México
712	El Fresno-Autopista Morelia-Uruapan km 379	Ziracuaretiro	Michoacán	<i>Zea perennis</i>	México
H1	Monajil-Buxup	Santa Ana Huista	Huehuetenango	Huehuetenango	Guatemala
G3	Km 162 Agua Blanca-Ipala, Agua Blanca	Agua Blanca	Jutiapa	<i>Zea luxurians</i>	Guatemala
919	Rancho Apacunca	Chinandega	Chinandega	<i>Zea nicaraguensis</i>	Nicaragua

En junio de 2011 se sembraron semillas de cada una de las 36 poblaciones de *Zea* en el invernadero del CIIDIR-IPN DURANGO. Todas las semillas fueron sembradas el mismo día y bajo las mismas condiciones. Para el análisis molecular se utilizó material foliar de cinco plantas de 30 a 75 días de edad, de cada población. El tejido foliar de cada plántula se analizó de manera individual. Para el análisis químico foliar se colectaron hojas de cinco individuos de una misma población y se combinaron (se analizaron 16 poblaciones). La colecta del tejido foliar se hizo de plantas de 60 días de edad. Para el análisis químico de polen, se colectaron muestras directamente de las anteras de cinco plantas de una misma población y se combinaron (se analizaron 17 poblaciones).

4.2 Caracterización molecular

4.2.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó de acuerdo al método reportado por Saghai-Marooof *et al.* (1984), que se basa en la utilización del detergente CTAB. Esto se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Durango (CIIDIR IPN Durango).

La cuantificación y la pureza del ADN obtenido de cada uno de los individuos de cada población, se realizó por medio de métodos espectrométricos estándares (Sambrook *et al.*, 1989), a partir de los registros de la A_{260} y la A_{280} de las soluciones de ADN.

La integridad y el tamaño molecular del ADN obtenido se apreció por electroforesis en geles de agarosa al 2% de acuerdo a protocolos estándar (Sambrook y Russell, 2001).

Se prepararon soluciones de ADN de concentración de 100 ng/uL y de 25 ng/uL para cada muestra para su posterior utilización en la amplificación de marcadores RAPD por medio de la técnica de PCR.

4.2.2 Amplificación de marcadores RAPD

La amplificación por PCR de dos marcadores RAPD se realizó de acuerdo a protocolos ya estandarizados. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L, utilizando 2 ng de una solución de ADN, 0.5 μ L de regulador de la enzima Taq polimerasa (Promega) 1X, $MgCl_2$ 1.75mM, solución de iniciador 1.5 μ M, solución de mezcla de nucleótidos (dNTPs) 0.2 mM, y Taq polimerasa (Promega) 0.1U.

Las secuencias de los iniciadores se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Secuencia de los iniciadores RAPD utilizados en el presente trabajo

INICIADOR	SECUENCIA 5'-3'
OPA 20	GTT GCG ATC C
OPA 10	GTG ATC GCA G

El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94° durante 3 min; 45 ciclos de desnaturalización a 94° durante 1 min, alineación a 36° durante 2 min, y extensión a 72° durante 2 min; y un periodo final de extensión de 10 min a 72°. La separación de los *loci* amplificados se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 1%, preparados de acuerdo a métodos estándar descritos por Sambrook *et al.* (1989). La visualización de los mismos, se realizó con SyberGreen (Invitrogen), de acuerdo a las indicaciones de la hoja técnica proporcionada por el fabricante.

4.3 Caracterización química

4.3.1 Extracción de fenoles de polen

Se colectó polen de las siguientes poblaciones: 201, 447, G3, 692, 669, 232, 483, 607, 623, 635, 650, 654, 684, 694, 705, 710 y 712. Se prepararon extractos fenólicos a partir de 100 mg de polen, que se maceraron en una solución acuosa de metanol-agua (50:50, v/v), en tubos Eppendorf de 2 mL de acuerdo a Markham y Campos (1996). Las muestras se sonicaron durante una hora, posteriormente se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes de cada una de las muestras se usaron para el análisis de UPLC-MS-TOF.

4.3. 2 Extracción de fenoles foliares

Se utilizaron las siguientes poblaciones: 201, 692, G3, 447, 487, 232, 694, 623, 607, 635, 650, 669, 654, 684, 705 y 710. Las hojas se secaron a temperatura ambiente y se molieron. Cada muestra (1 g de tejido foliar seco y molido de cada una de las poblaciones) se maceró en 10 mL de una solución de metanol agua (80:20, v/v), en oscuridad, durante 24 h, a temperatura ambiente. Después de ese tiempo, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min, se recupero el sobrenadante y se filtraron a través de una membrana de tamaño de poro de 0.45 µm para el análisis de UPLC-MS-TOF.

4.3.3 Análisis de UPLC-MS (TOF)

El análisis de UPLC-MS-TOF se realizó en el Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional (CIDAF), de la Universidad de Granada, España. La separación de compuestos fenólicos de hoja y polen se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (UPLC) (Agilent Technologies, CA, serie 1200) que consiste en un desgasificador al vacío, un inyector automático, y una bomba binaria. La columna analítica usada fue Eclipse Plus C18 (4.6 x 150 mm, 1.8 μ m).

La fase móvil del análisis consistió de agua acidificada con ácido acético (0.5%) como solvente A y acetonitrilo como solvente B. La proporción de los solventes cambió de acuerdo a las siguientes condiciones: de 0 a 10 min, 95% (A): 5% (B) a 70% (A):30% (B), de 10 a 12 min, 67 % (A): 33% (B) a 62% (A): 38% (B); de 17 a 20 min, 62% (A):38% (B) a 50% (A):50% (B); de 23 a 25 min, 5% (A):95% (B) a 95% (A):5% (B); de 25 a 35 min, 95% (A):5% (B) a 95% (A):5% (B). La velocidad de flujo fue de 0.8 mL/min a lo largo del análisis. El volumen de inyección fue de 10 μ L.

El sistema de UPLC fue acoplado a un micrOTOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania), un analizador de tiempo de vuelo (TOF) de espectrometría de masas, utilizando una interfase ESI (ionización por electrospray).

Los datos de la masa exacta de los iones moleculares fueron procesados a través de un software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania), el cual proporciona una lista de posibles fórmulas mediante un editor de fórmulas inteligentes (Smart Formula Editor).

4.4 Análisis de datos

El perfil de amplificación por PCR de cada muestra se construyó con todos los fragmentos resueltos en los respectivos electroferogramas. Cada fragmento se consideró un carácter molecular individual. Se construyó una matriz binaria de presencia/ausencia de bandas (1: presencia, 0: ausencia) formada por todas las muestras individuales (fragmentos vs individuos), que se sometió a un análisis genético usando el programa de cómputo PAST 2.12 (Hammer *et al.*, 2001). El

programa Popgen 1.32 (Yeh *et al.*, 1999) se utilizó para calcular los estimadores de variabilidad (polimorfismo, diversidad genética, e índice de Shannon).

Se construyeron matrices binarias de presencia/ausencia con todos los compuestos fenólicos identificados en las muestras de polen, y de manera independiente, en las muestras de tejido foliar. Las matrices se sometieron a análisis fenético usando el programa PAST 2.12.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Análisis molecular

Un total de 47 loci fueron amplificados por los dos marcadores RAPDs (19 a partir de OPA 10 y 28 a partir de OPA 20) para todas las muestras analizadas. Los 47 fragmentos amplificados fueron polimórficos. Trabajos como el de Ayres *et al.* (1999) en su estudio con *Spartina alterniflora* y *S. foliosa* (Poaceae) utilizaron siete marcadores RAPDs el cual produjo un total de veinte bandas. Esselman *et al.* (1999), utilizando tres marcadores RAPDs reportan un total de 40 bandas para *Calamagrosti porteri* ssp. *insperata* (Poaceae). Ayres *et al.* (2001) utilizando tres marcadores RAPDs reportan 40 bandas amplificadas en total para *Spartina ánglica* (Poaceae) En la Figura 6 se muestra un ejemplo de la variabilidad que se encontró en los patrones de amplificación de loci para seis poblaciones de *Zea*, cinco de la ssp. *parviglumis* y una de la ssp. *mexicana*.

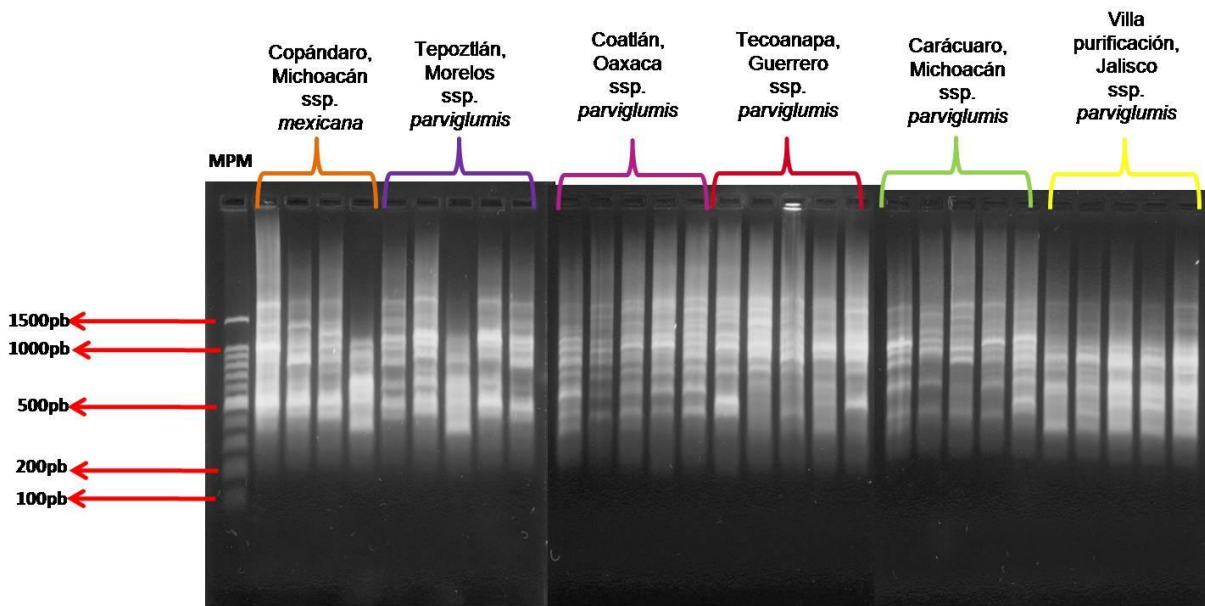


Figura 6. Patrones de amplificación utilizando el iniciador OPA20

Con el marcador OPA 10 los perfiles de amplificación variaron desde 3 loci en algunos individuos de las poblaciones H1 y 712, a 11 en un individuo de la población 426. Con el marcador OPA 20 la variación en los perfiles amplificados también fue de

3 loci en cuatro individuos de la población 679 a 11 en un individuo de la población 710. Perfiles con un mismo número de loci amplificados fueron diferentes.

Para la estimación de la variabilidad genética se tomó en cuenta el total de loci amplificados por ambos marcadores utilizados. Se calcularon los valores de polimorfismo, diversidad genética e índice de Shannon utilizando el programa POPGENE versión 1.32, estos valores se reportan en la Tabla 6.

Tabla 6. Porcentaje de polimorfismo, diversidad genética e índice de Shannon detectado con dos marcadores de iniciadores RAPDs en 36 poblaciones teocintle

Población	Polimorfismo %	Diversidad genética (Nei)	Índice de Shannon
201-Ejutla, Jalisco	29.79	0.1039±0.1795	0.1555±0.2579
232-Tolimán, Jalisco	8.51	0.0255±0.0910	0.0399±0.1376
426-Churintzio, Michoacán	25.53	0.0832±0.1574	0.1272±0.2319
447-Uriangato, Guanajuato	17.02	0.0758±0.1740	0.1077±0.2448
450-Copándaro, Michoacán	25.53	0.0973±0.1803	0.1433±0.2579
474-Tepoztlán, Morelos	31.91	0.1271±0.1994	0.1853±0.2842
483-San Jeronimo Coatlán, Oaxaca	21.28	0.0748±0.1593	0.1119±0.2300
487-Tecoanapa, Guerrero	21.28	0.0804±0.1643	0.1190±0.2386
517-Carácuaro, Michoacán	17.02	0.0541±0.1292	0.0836±0.1940
546-Villa de Purificación, Jalisco	17.02	0.0597±0.1440	0.0895±0.2095
551-Cuautitlan de García Barragán, Jalisco	2.13	0.0074±0.0509	0.0114±0.0778
607-Guadalupe y Calvo, Chihuahua	19.15	0.0585±0.1355	0.0905±0.2003
615-Chapultepec, México	10.64	0.0399±0.1228	0.0591±0.1784
623-Aljojuca, Puebla	17.02	0.0690±0.1591	0.1005±0.2290
635-Amecameca, México	6.38	0.0187±0.0756	0.0296±0.1175
638-Chalco, México	4.26	0.0145±0.0766	0.0218±0.1107
643-Huitzuc de los Figueroa, Guerrero	0	0	0
646-Olinalá, Guerrero	4.26	0.0156±0.0797	0.0231±0.1152
650-Quechultenango, Guerrero	12.77	0.0490±0.1318	0.0727±0.1942
645-Chilpancingo de los Bravo, Guerrero	21.28	0.0704±0.1483	0.1074±0.2185
657-Mochitlán, Guerrero	21.28	0.0467±0.1003	0.0792±0.1616
661-Teloloapan, Guerrero	17.02	0.0659±0.1520	0.0972±0.2214
666-Ixcateopan de Cuauhtémoc, Guerrero	14.89	0.0346±0.935	0.0577±0.1473
669-Teloloapan, Guerrero	4.26	0.0080±0.0385	0.0143±0.0688
679-Tejupilco, México	12.77	0.0306±0.0907	0.0505±0.1415

684-Huetamo, Michoacán	6.38	0.0179±0.0769	0.0283±0.1163
685-Ayotlán, Jalisco	19.15	0.0711±0.1561	0.1057±0.2269
692-Huajicori, Nayarit	19.15	0.0767±0.1680	0.1116±0.2397
694-San Gabriel, Jalisco	29.79	0.1042±0.1771	0.1564±0.2566
705-Nombre de Dios, Durango	31.91	0.1114±0.1762	0.1681±0.2587
710-Durango, Durango	34.04	0.1154±0.1758	0.1752±0.2586
712-Ziracuaretiro, Michoacán	29.79	0.0940±0.1601	0.1451±0.2379
H1-Huehuetenango, Guatemala	23.4	0.0928±0.1788	0.1355±0.2560
G3-Jutiapa, Guatemala	31.91	0.1160±0.1808	0.1736±0.2649
919-Chinandega, Nicaragua	10.64	0.0343±0.1071	0.0528±0.1602
674-Amatepec, México	14.89	0.0446±0.1078	0.0710±0.1715

En la Tabla 6 se observa una relación directa entre el polimorfismo y la diversidad genética (Nei) y el Índice de Shannon. Las poblaciones con mayor porcentaje de polimorfismo, arriba del 30%, fueron 710, 474, 705 y G3. Entre el 30 y el 20% de polimorfismo detectado, se encuentran las poblaciones 201, 694, 712, 426, 450, H1, 483, 487, 645, 657. La mayoría de las poblaciones tuvieron un polimorfismo entre el 19 y 10% estas fueron la 607, 685, 692, 447, 517, 546, 623, 661, 666, 674, 650, 679, 615, 919. La población 643 fue genéticamente homogénea para ambos marcadores RAPD.

Los niveles de variabilidad encontrados para las poblaciones de *Zea* analizadas fueron más altos que los reportados para *Bromus tectorum* (Poaceae) (polimorfismo de 0 a 16%) por Bartlett *et al.* (2002), usando enzimas. Fueron similares a los valores que proporcionan Li y Ge (2001) (polimorfismo entre 6.1 y 26.8%, e índice de Shanon entre 0.0163 a 0.1160) para *Psammochloa villosa* (Poaceae), usando ISSR; pero fueron más bajos que los reportados por Fukunaga *et al.* (2005) para siete taxa de *Zea* (diversidad genética entre 0.65 y 0.89), usando microsatélites; y también más bajos que los reportados por Martínez-Palacios *et al.* (1999) (polimorfismo de 60 a 100%) para *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae y monocotiledónea como *Zea*), basándose en isoenzimas. La baja variabilidad encontrada para *P. villosa*, los autores (Li y Ge, 2001) la asociaron a su mecanismo reproductivo, que es por rizomas, el cual es de naturaleza clonal.

Sin embargo la variabilidad detectada en las poblaciones de teocintle, con los dos marcadores RAPD utilizados fue muy baja.

De acuerdo a Francisco-Ortega *et al.* (1996) y a Silvertown y Charlesworth (2001), la variabilidad genética de las poblaciones se define por cuatro factores, que son la capacidad de dispersión, el mecanismo de reproducción, la deriva génica, y la selección natural. Para las poblaciones vegetales, el mecanismo reproductivo es el factor principal que determina la variabilidad genética (Sosa, 2003), siendo los grupos de fertilización cruzada los que poseen la variabilidad más alta (Silvertown y Charlesworth (2001). Las especies de *Zea* presentan mecanismos reproductivos vegetativos y sexuales, siendo la principal la producción de semillas, con polinización cruzada (De la Cruz, 2007). Esas características favorecerían niveles altos de variabilidad genética en las poblaciones de *Zea* analizadas, de acuerdo a Sosa (2003). Sin embargo, las siguientes características favorecerían niveles bajos de variabilidad genética en las poblaciones del género: a) los elementos de *Zea* son autocompatibles, b) las hibridaciones entre los diferentes taxa del género no siempre son exitosas debido a barreras genéticas (De la Cruz, 2007), c) a pesar de que se han reportado hibridación e introgresión entre especies y poblaciones de *Zea*, Ross-Ibarra *et al.* (2009) consideran que esos eventos son más bien de carácter histórico, es decir de ocurrencia no actual, y d) la distribución natural presente, en forma no simpátrica, de las poblaciones de *Zea* (Sánchez *et al.*, 2011). Una baja variabilidad también sería favorecida si, como ocurre en maíz Bt (maíz transgénico que expresa toxinas de *Bacillus turingiensis*), el polen de los teocintles tuviera un alcance de dispersión de 5 m (Sears y Standley-Horn, 2000).

La capacidad de los marcadores RAPDs para detectar variabilidad genética entre las 36 poblaciones de *Zea* analizadas, se determinó sometiendo la matriz respectiva a un análisis de agrupamiento, utilizando el método de Ward (Figura 7).

En el dendograma obtenido no se muestra una clara separación de las dos secciones en que ha sido dividido el género *Zea*, ni la separación de las especies y subespecies reconocidas en ese género por varios autores (Doebley e Iltis, 1980; Iltis y Doebley, 1980; Doebley, 1990; Iltis y Benz, 2000; Sánchez *et al.*, 2011). En cambio, el análisis de agrupamiento revela una cercana relación entre los diferentes teocintles pertenecientes a *Z. ssp. parviglumis* y *Z. ssp. mexicana* como ha sido propuesto por Doebley *et al.* (1987). Estos resultados no concuerdan con los de

Wang *et al.* (2011) quienes sí reportaron la separación de especies y subespecies como han sido propuestas por Doebley e Iltis (1980), Iltis y Doebley (1980), Doebley (1990), Iltis y Benz (2000), Sánchez *et al.* (2011), analizando un individuo por población y utilizando también marcadores RAPD; sin embargo, ninguno de los 136 empleados por esos autores corresponde al OPA10 u OPA 20 usados en el presente estudio, los cuales, de acuerdo a los resultados obtenidos amplifican regiones conservadas en los genomas de los diferentes taxa de *Zea*. La evolución asincrónica de diferentes regiones del genoma, reportada por varios autores (Graur y Li, 2000), podría explicar las diferencias encontradas entre los resultados de Wang *et al.* (2011) y los encontrados en el presente estudio con marcadores RAPD.

Una tendencia de agrupación por población se puede observar en el dendrograma de la Figura 7. En poblaciones como 638 (*Zea mays* ssp. mexicana raza Chalco), 551 (*Z. diploperennis*), 669 (*Z. mays* ssp. *parviglumis* raza Balsas), 666 (Balsas), y 643 (*Z. mays* ssp. *parviglumis* raza Balsas) los individuos de cada una de ellas presentan el mismo perfil de amplificación correspondiente a su población. Lo anterior sugiere que los marcadores RAPD utilizados podrían ser marcadores útiles para la tipificación de poblaciones de *Zea*.

Los grupos que se señalan en el dendrograma de la Figura 7 muestran una tendencia de agrupamiento de poblaciones por regiones geográficas. El grupo 1 comprende dos poblaciones de Michoacán (450, Mesa Central; y 517, Balsas), una de Morelos (474, Balsas), una de Guerrero (487, Balsas), y una de Oaxaca (483, Balsas). El grupo 2 comprende tres poblaciones de Jalisco (201, Balsas, 232, Balsas, y 546, Balsas), una de Michoacán (426, Mesa Central), una de Guanajuato (447, Mesa Central), y una del Estado de México (638, Chalco). El grupo 3 incluye tres poblaciones del Estado de México (638, Chalco; 635, Chalco; y 615, Chalco), la población 501 de *Zea diploperennis* de Jalisco, una de Puebla (623, Chalco), y una de Chihuahua (607, Nobogame). En el grupo 4, se incluyen nueve poblaciones de Guerrero (679, 657, 650, 666, 669, 654, 661, 646, 643, todas de la raza Chalco), y un individuo de la población 674, Balsas, del Estado de México. El grupo 5 incorpora una población de Nicaragua (919, *Z. nicaraguensis*), y dos de Guatemala (H1, Huehuetenango, y G3, *Z. luxurians*), un individuo de la población 674 (Balsas del

Estado de México), y un individuo de la población 684 (Balsas de Michoacán). El grupo 6 incluye una población de Michoacán (684, Balsas), una de Jalisco (685, Mesa Central), y un individuo de la población 705 (Mesa Central, de Durango). El grupo 7 comprende una población de Jalisco (694, *Z. perennis*), una de Nayarit (692, *Z. diploperennis*), un individuo de la población 201 de la raza Balsas de Jalisco, uno de la población 705 (Mesa Central, de Durango), y uno de la población 450 (Mesa Central, de Michoacán). Por último, el grupo 8 que incluye la población 712 (*Z. perennis*, de Michoacán), 710 y 705 (ambas Mesa Central, de Durango), un individuo de la población 694 (*Z. perennis* de Jalisco), y un individuo de la 474 (Balsas, de Morelos). Aunque esa agrupación de poblaciones de teocintles no corresponde claramente a la propuesta por otros autores (Fukunga *et al.*, 2005), quienes reconocen cinco grupos geográficos para *Z. mays ssp. parviglumis* (Balsas este, Balsas central, Jalisco, Oaxaca, y sur de Guerrero), y cinco para *Z. mays ssp. mexicana* (Mesa Central, Chalco, Durango, Nobogame, y Puebla), los marcadores RAPD utilizados en el presente estudio revelaron una tendencia de agrupamiento similar.

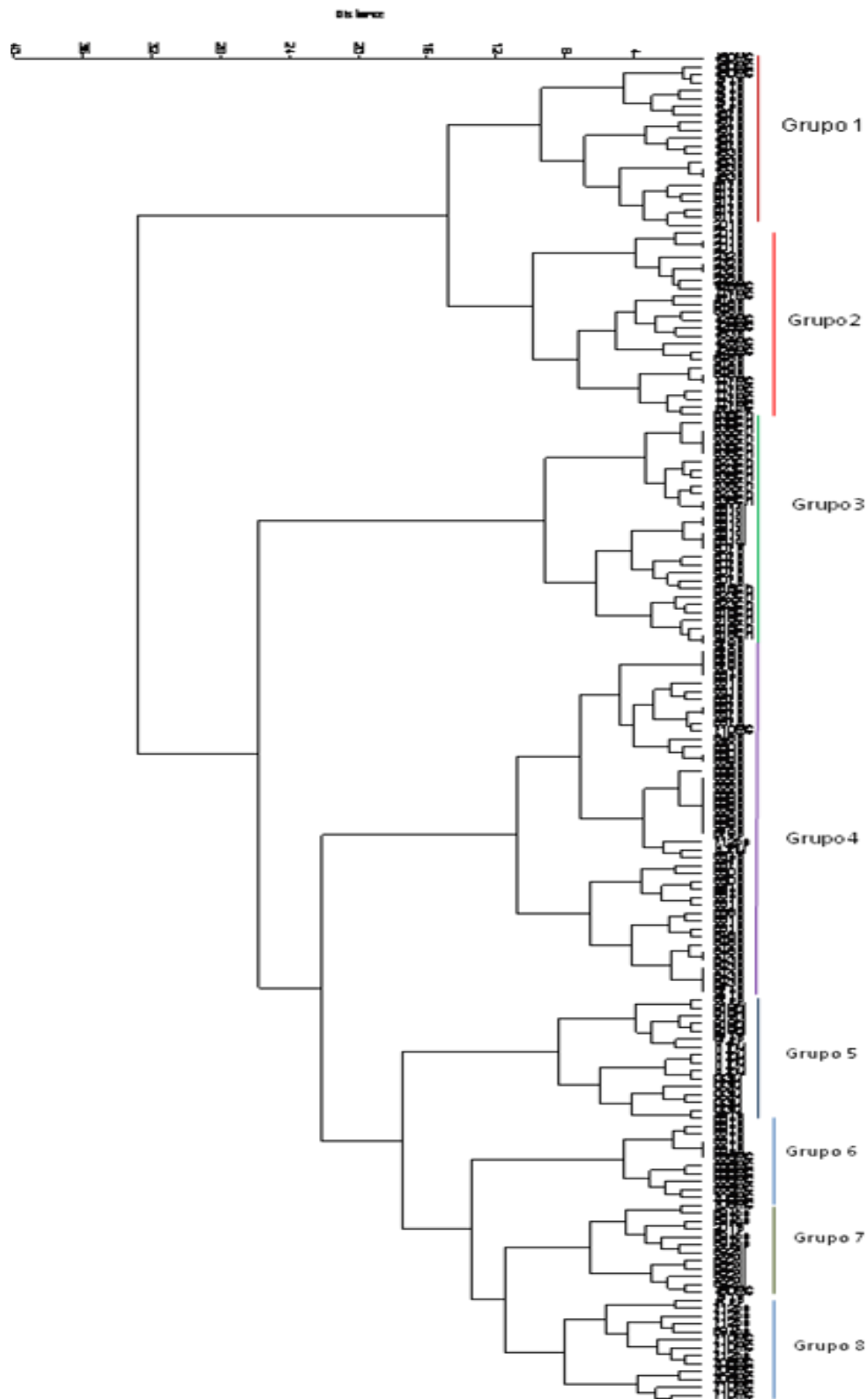


Figura 7. Dendrograma generado a partir de la combinación de los dos marcadores RAPDs

5.2 Perfiles fenólicos de polen

Se identificó un total de 19 compuestos fenólicos en las 17 poblaciones de *Zea* analizadas. La relación de los compuestos, indicando la identificación propuesta, los tiempos de retención (TR), la masa exacta (m/z), la fórmula, y la estructura química se presentan en el Tabla 7. De los 19 compuestos, 15 fueron flavonoles, tres ácidos fenólicos y uno se identificó como flavanona.

Los compuestos **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, **10**, **12**, **13**, **14**, **15**, **17** y **19** estuvieron presentes en todas las poblaciones analizadas de *Zea*. Los principales compuestos, por ser los acumulados en mayor cantidad y por encontrarse en todas las muestras analizadas, fueron el **4**, **6**, **8**, **9**, **10**, y **13**. La tendencia de acumulación de fenoles en el polen fue la misma para todas las poblaciones. En la Figura 8 se muestra el cromatograma de la población 694, a manera de ejemplo, para mostrar los seis principales compuestos encontrados y la tendencia de acumulación de fenoles de todas las poblaciones analizadas. El compuesto **1** y **11** estuvo presente en todas las poblaciones, excepto en la población 692 que pertenece a *Z. diploperennis*. El compuesto **16** solo se encontró en las poblaciones 650, 654, 705 y G3. El compuesto **18** solo estuvo presente en las poblaciones perennes 692 (*Z. diploperennis*) y 694 (*Z. perennis*).

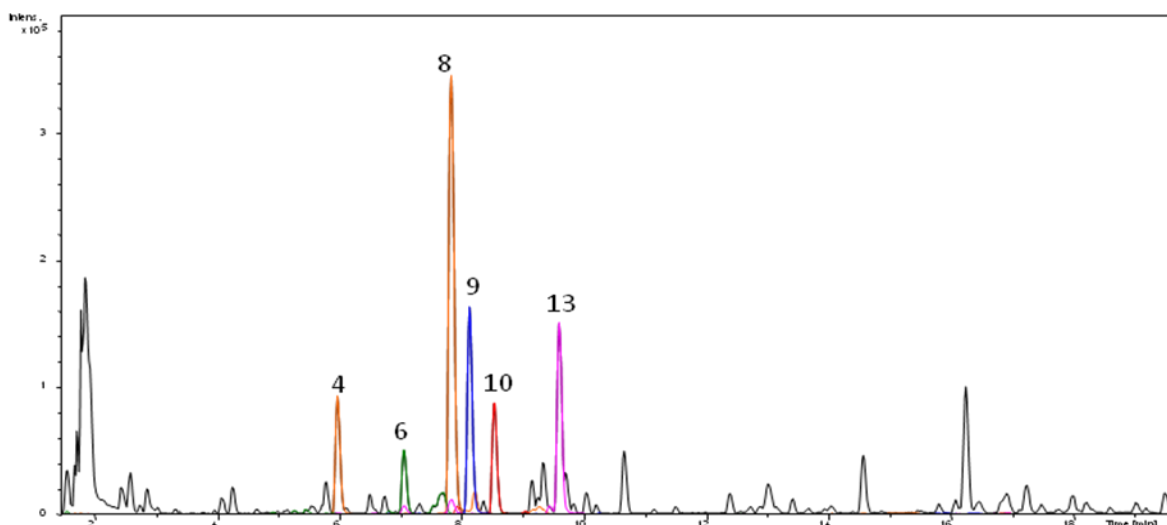
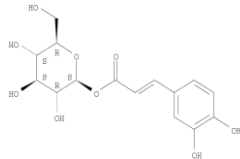
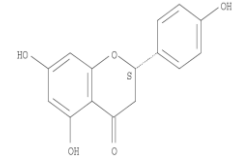
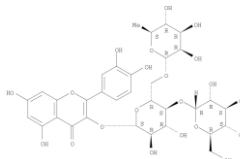
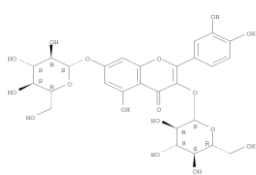
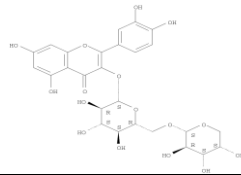
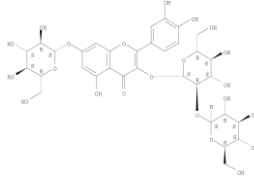
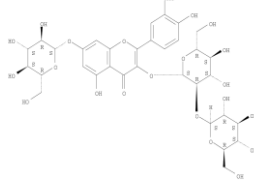
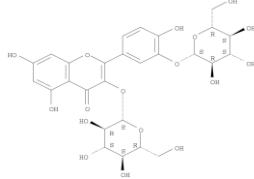
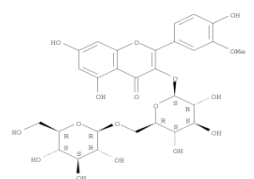
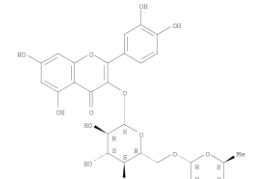


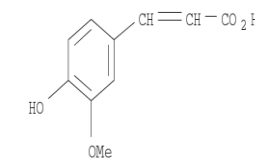
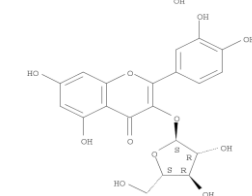
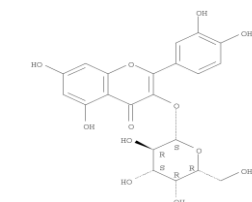
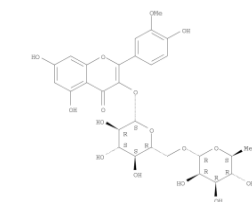
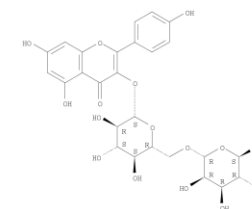
Figura 8. Cromatograma de la población 694 donde se muestran los seis compuestos más importantes encontrados en el polen de todas las poblaciones analizadas de *Zea*. **4:** Quercetina-3-O-glucosido-7-O-glucosido, **6:** Quercetina-3-soforosido-7-glucosido, **8:** Quercetina-3,3'-O-diglicosido, **9:** Isoramnetina-3-O-gentiobiosido, **10:** Quercetina rutinosido, **13:** Quercetina-3-galactosido

Tabla 7. Compuestos encontrados en polen con UPLC-MS (TOF)

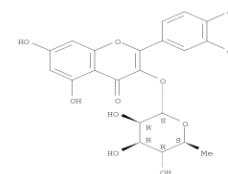
N° Compuesto	Familia	Compuesto posible	TR (min) $\bar{X} \pm DS$	m/z Calculada	Error (ppm)	mSigma	Formula molecular	Estructura
1	Ácido fenólico	1-Cafeilglucosa	3±0.014	341.0878	6.6	5.4	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	
2	Ácido fenólico	vainillin glucósido	4.743±0.081	313.0928	1.5	11.4	C ₁₄ H ₁₇ O ₈	
3	Flavonol	α-Glucopiranosil rutina	5.171±0.086	771.1989	0.4	10.8	C ₃₃ H ₃₉ O ₂₁	
4	Flavonol	Quercetina-3-O-glucosido-7-O-glucosido	6.042±0.083	625.1402	1.7	3.7	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇	
5	Flavonol	Quercetina 3-vicianosido	6.179±0.084	595.1304	1.2	5.7	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₆	

6	Flavonol	Quercetina 3-sophorosido 7-glucosido	7.122±0.078	787.1938	0.8	9.9	C ₃₃ H ₃₉ O ₂₂	
7	Flavonol	Isoramnetina 3-sophorosido 7-glucosido	7.349±0.072	801.2095	1.5	8.6	C ₃₄ H ₄₁ O ₂₂	
8	Flavonol	Quercetina-3,3'-O-diglucosido	7.873±0.076	625.1429	0.9	3.2	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇	
9	Flavonol	Isoramnetina 3-O-gentiobiosido	8.173±0.065	639.1567	1.1	4.5	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₇	
10	Flavonol	Quercetina rutinosido	8.553±0.156	609.1461	0.5	3.8	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	

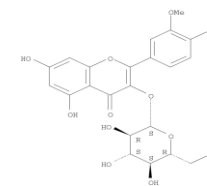
11	Flavonol	Canferol 3-β-rutinosido	9.293±0.060	593.1511	0.8	8.9	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅
12	Flavonol	Isoramnetina 3-O-β-rutinosido	9.376±0.063	623.1617	1.2	8.3	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₆
13	Flavonol	Quercetina 3-galactosido	9.617±0.102	463.0882	0.8	6.4	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂
14	Flavonol	Quercetina 3-α-L-arabinofuranosido	10.089±0.072	433.0776	4	8.9	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁
15	Ácido fenólico	Ácido ferúlico	10.273±0.077	193.0506	4.6	12.2	C ₁₀ H ₉ O ₄



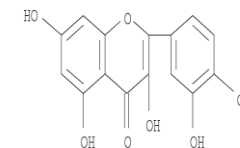
16	flavonol	Quercetina ramnosido	10.537±0.461	447.0932	2.7	22.5	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁
----	----------	----------------------	--------------	----------	-----	------	---



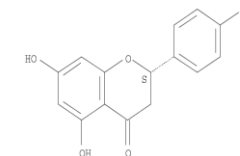
17	flavonol	Isoramnetina 3-O-D-glucosido	10.669±0.053	477.1038	4	9.8	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂
----	----------	------------------------------	--------------	----------	---	-----	---



18	flavonol	Quercetina	14.499±0.033	301.0354	4.9	3.9	C ₁₅ H ₉ O ₇
----	----------	------------	--------------	----------	-----	-----	---



19	Flavanona	Naringenina	17.307±0.127	271.0612	3.4	9.4	C ₁₅ H ₁₁ O ₅
----	-----------	-------------	--------------	----------	-----	-----	--



De los 19 compuestos el número **8**, Quercetina-3,3'-O-diglucosido, fue el principal compuesto, ya que se encontró presente en todas las poblaciones analizadas y a la mayor concentración. Ceska y Styles (1984) también reportaron este compuesto como el principal en el polen de maíz, además de canferol-3-O-glucósido (fórmula: $C_{21}H_{20}O_{11}$, peso molecular: 448.38), sin embargo, de acuerdo a los resultados del presente estudio, en el polen de teocintle se encontró canferol-3- β -rutinosido como el único glicósido de canferol (compuesto **11**, Tabla 7). Estos mismos autores reportaron la ausencia de flavonas en el polen del maíz, lo que los resultados del presente estudio confirmaron. Ceska y Styles (1984) también reportaron cuatro glicósidos de isoramnetina, contrario a lo que reportaron Pollak *et al.* (1995), quienes no encontraron isoramnetina en el polen de maíz. En el presente estudio, un solo derivado de canferol se encontró en polen de todas las poblaciones de teocintle. Derivados de esos mismos flavonoides, canferol, quercetina, e isoramnetina, han sido encontrados en el polen de *Echium platagineum* (Boraginaceae) (Ferrres *et al.*, 2010).

Los flavonoles glicosidos son los más comunes en el polen (Campos *et al.*, 2002), los que se encuentran más frecuentemente son los derivados de quercetina, isoramnetina y canferol (Campos, 1997; Almaraz-Abarca *et al.*, 2004; Almaraz-Abarca *et al.*, 2007). En este trabajo, de los 19 compuestos propuestos fenólicos encontrados, 9 fueron derivados glicósidos de quercetina, cuatro fueron derivados glicósidos de isoramnetina, y uno fue derivado glicósido de canferol.

Tao *et al.* (2011) reportaron un total de 11 compuestos fenólicos en el polen de *Typha angustifolia* (Typhaceae), siendo el compuesto principal un derivado ramnosil rutinósido de isoramnetina, y en menor concentración esos autores reportaron dos derivados de quercetina, tres derivados de canferol, dos más derivados de isoramnetina (excluyendo el compuesto principal), una quercetina aglicona, y una flavanona (naringenina). Estos dos últimos compuestos también fueron encontrados en este estudio, la quercetina aglicona solo en el polen de la población 692 que pertenece a la especie *Z. diploperennis* y en el de la 694 que pertenece a *Z. perennis*. La naringenina estuvo presente en el polen de todas las poblaciones de *Zea* analizadas. Sin embargo algunos autores (Delalonde *et al.*, 1996), basándose en

datos de espectrometría UV, reportaron seis flavonoles glicósidos y la quercetina aglicona como componentes de las anteras de maíz, y citan a Ibrahim (1965) el cual también hace mención de este compuesto en el polen de *Zea mays*.

Existen pocos reportes sobre la presencia de flavonoides agliconas en el polen, entre ellos están los de Campos *et al.* (1997) en *Eucalyptus globulus* y Campos *et al.* (2002) en el polen de Myrtaceae.

Los flavonoides desempeñan importantes papeles en las plantas (Winkel-Shirley, 2001), en particular los flavonoides de canferol y quercetina son fundamentales en varias especies, incluyendo maíz (Mo *et al.*, 1992) para que el desarrollo y la germinación del tubo polínico pueda llevarse a cabo.

De acuerdo a los resultados del presente trabajo, podemos observar que hay un dominio de los glicósidos de quercetina sobre los glicósidos de canferol en el polen de las diferentes poblaciones de teocintle analizadas (Tabla 7), por lo que se puede sugerir que la quercetina probablemente desempeñe un papel similar en la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico en los teocintles.

Los flavonoides son los fenoles con mayor importancia como marcadores quimiotaxonómicos (Markham, 1982; Herrera y Bain, 1991; Campos y Markham, 2007; Almaraz-Abarca *et al.*, 2004), pero los ácidos fenólicos también poseen cierto valor como marcadores químicos (Van Sumere, 1989), y pueden acumularse en niveles significativos en los tejidos vegetales (Tamagnone *et al.*, 1998). El polen de algunas plantas es particularmente rica en ácidos fenólicos (Campos, 1997; Almaraz-Abarca *et al.*, 2004; Almaraz-Abarca *et al.*, 2007), pero puede estar completamente ausente en el polen de otros (Almaraz-Abarca *et al.*, 2009).

El polen de las diferentes poblaciones de teocintle se obtuvieron de plantas que crecieron en invernadero por lo que estuvieron sometidas bajo las mismas condiciones ambientales, esto lo podemos relacionar a que las diferencias encontradas en los perfiles fenólicos de polen son el resultado de las diferencias genéticas, ya que cada vía biosintética es comandada por un orden secuencial definido, de acuerdo con Heller y Formann (1994) ese orden es específico para cada especie vegetal, y para muchos de los pasos individuales, existen genes

estructurales que codifican las enzimas que participan directamente en la formación de flavonoides (Forkmann, 1994).

Para el análisis fenético de cluster se elaboró una matriz de datos considerando la presencia/ausencia de cada uno de los 19 compuestos encontrados vs. cada una de las poblaciones analizadas. El dendrograma obtenido a partir de este análisis se muestra en la Figura 9. En él se observan cinco grupos. *Zea diploperennis* se agrupó sola en un cluster, las dos poblaciones de *Z. perennis* formaron juntas otro grupo, las dos subespecies, *parviglumis* y *mexicana*, forman de manera mezclada los otros tres grupos. *Zea luxurians*, que de acuerdo a Doebley e Iltis (1980) forma junto con *Z. perennis* y *Z. diploperennis* la sección *Luxuriantes* del género *Zea*, no se incluyó en ninguno de los grupos de *Z. perennis* ni *Z. diploperennis*, sino que formó parte del grupo de *parviglumis* (650 y 654) y *mexicana* (705). Estos resultados no están de acuerdo con la división del género *Zea* en la sección *Zea* y la sección *Luxuriantes* propuesta por Zimmer *et al.* (1988), Purugganan y Wesler (1994), Buckler y Holtsford (1996), Tiffin y Gaut (2001).

Los perfiles fenólicos del polen pueden llegar a discriminar taxa a niveles infraespecíficos, como en el género *Equisetum* subgénero *Equisetum* (Veit *et al.*, 1995); sin embargo, de acuerdo a los resultados del presente estudio, los perfiles fenólicos del polen de las subespecies *mexicana* y *parviglumis* no permiten la discriminación entre ambas.

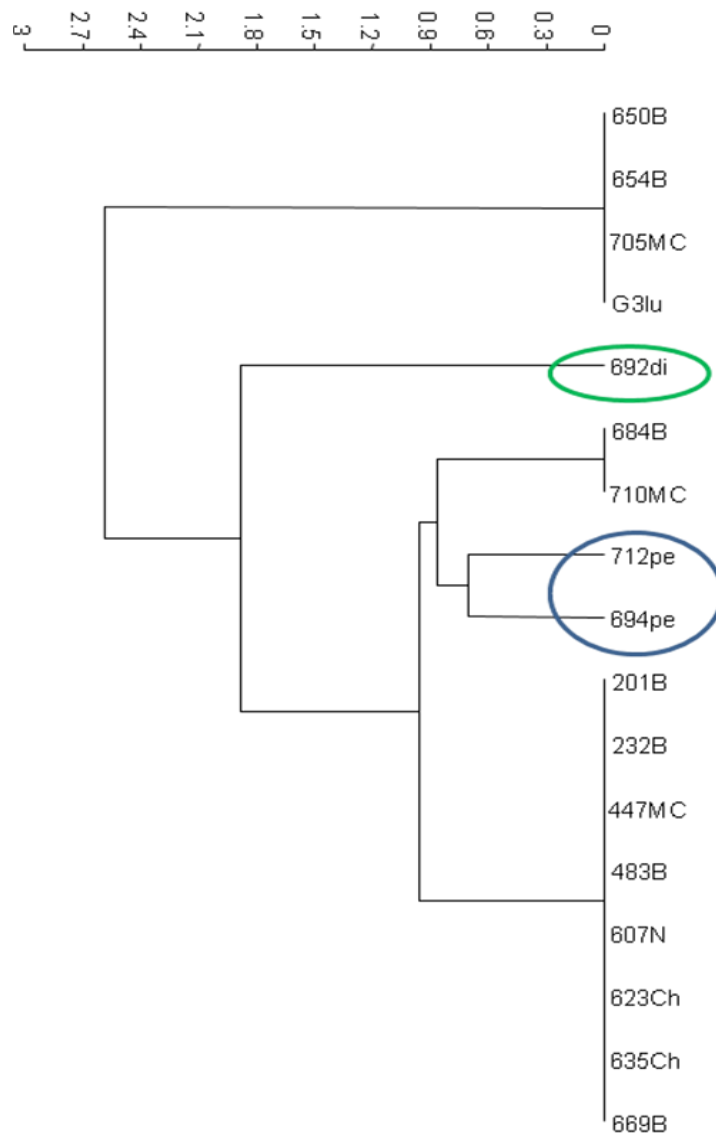


Figura 9. Agrupamiento de las diferentes poblaciones de *Zea*, de acuerdo a los perfiles fenólicos de polen (B= raza Balsas, MC= raza Mese Central, Ch= raza Chalco, N= raza Nabogame, lu= *Z. luxurians*, di= *Z. diploperennis*, pe= *Z. perennis*).

5.3 Perfiles fenólicos de hoja

Se identificó un total de 55 compuesto fenólicos en las hojas de las poblaciones de *Zea* analizadas. De ellos, 24 fueron flavonas, 18 flavonoles, 10 ácidos fenólicos, una isoflavona, una teaflavina y un flavanol. Los datos obtenidos del análisis UPLC-MS-TOF para cada uno de los 55 compuestos se muestran en el Tabla 8. De todos los compuesto encontrados los compuestos **1, 2, 3, 5, 10, 21, 26, 30, 32, 33, 40, 41, 43, 50, 51, 52, 53, 54, y 55** están presentes en todas las poblaciones analizadas en *Zea*, de estos 19 compuestos, ocho fueron los principales, ya que aparte de estar en todas las poblaciones analizadas, fueron los que se cumularon a una concentración mayor. En la Figura 10 se muestra el cromatograma de la población 694, como ejemplo para mostrar los ocho compuestos principales.

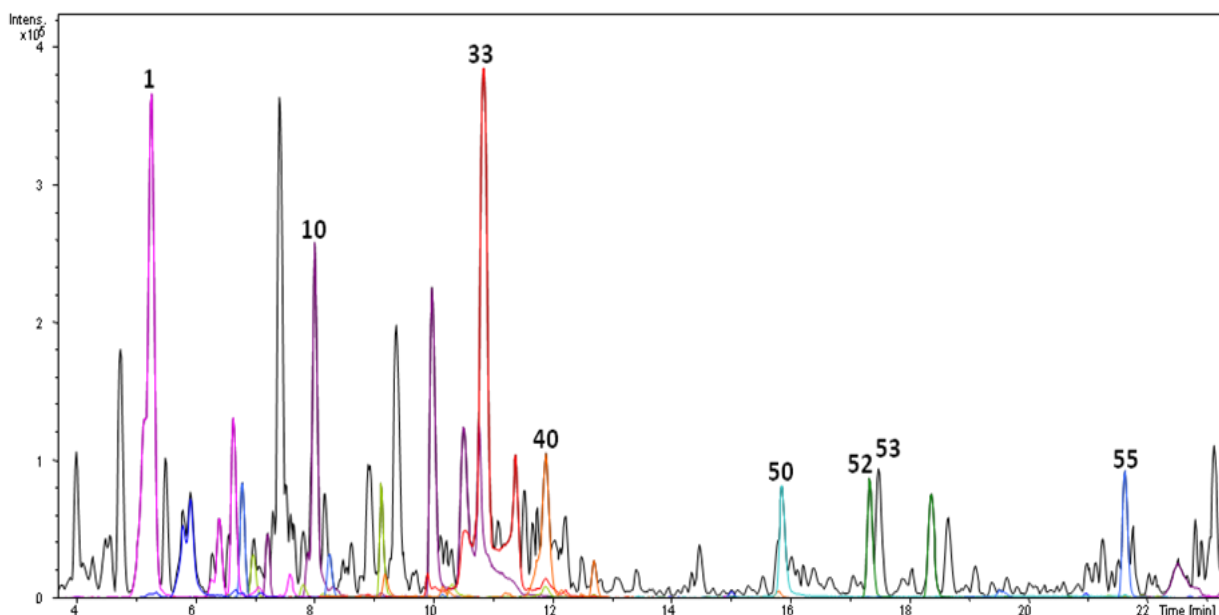
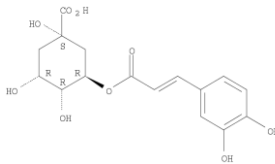
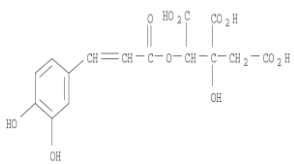
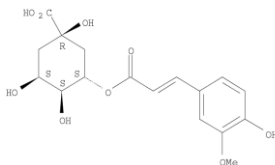
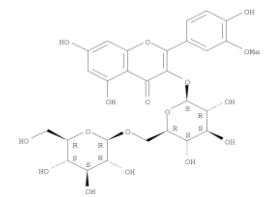


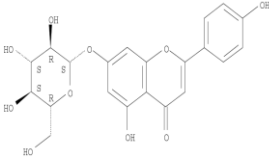
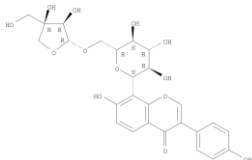
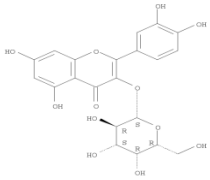
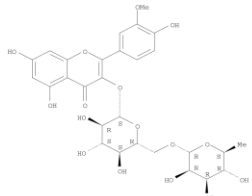
Figura 10. Cromatograma correspondiente al tejido foliar de la población 694 (*Zea perennis*), en el que se muestran los ocho compuestos principales encontrados en tejido foliar de todas las poblaciones. **1:** Ácido cloragénico, **10:** Canferol 3-O- β -rutinosido, **33:** Maisina, **40:** Diosmetina 7-O-ramnosil (1 \rightarrow 6)-glucosido, **50:** Teaflavina, **52:** Tricina 4'-O-(eritro- β -gaucilgliceril)ether, **53:** 3'5'-O-Dimetiltricetina, **55:** Epicatequina 3-O-galato

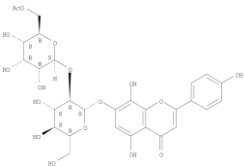
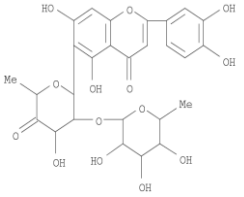
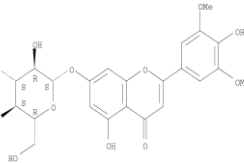
Tabla 8. Compuestos encontrados en tejido foliar por UPLC-MS (TOF)

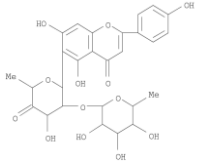
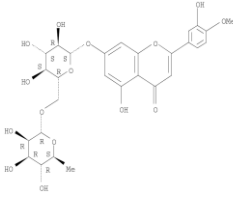
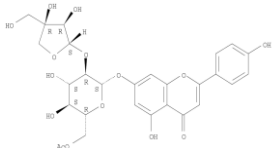
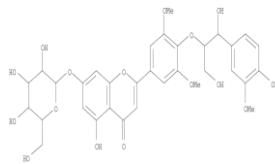
N° compuesto	Familia	Compuesto posible	TR (min) $\bar{X} \pm DS$	m/z calculada	Error (ppm)	mSigma	Fórmula molecular	Estructura
1	Ácido fenólico	Ácido cloragénico (Isómero 1)	5.300±0.179	353.088	1.1	4.3	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	
2	Ácido fenólico	2-O-trans-Cafeoil (Isómero 1)	6.116±0.343	369.046	0.8	2.4	C ₁₅ H ₁₃ O ₁₁	
3	Ácido fenólico	Ácido cloragénico (Isómero 2)	6.392±0.050	353.088	1	5.5	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	
4	Ácido fenólico	Acido clorogénico (Isómero 3)	6.634±0.059	353.088	1.9	1.2	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	
5	Ácido fenólico	Ácido 3-feruloilquinico	6.784±0.054	367.103	0.7	2.8	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	
6	Flavonol	Quercetina rutinosido (Isómero 1)	6.976±0.081	609.146	0.7	1.9	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	

7	Flavonol	Canferol 3-O- β -rutinosido (Isómero 1)	7.214 \pm 0.059	593.151	0.9	9	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	
8	Ácido fenólico	2-O-trans-Cafeoil (Isómero 2)	6.623 \pm 0.011	369.046	2	2	C ₁₅ H ₁₃ O ₁₁	
9	Flavona	Apigenina 8-C- α -L-arabinosido 6-C- β -D-glucosido (Isómero 1)	7.972 \pm 0.065	563.141	0.9	7.9	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄	
10	Flavonol	Canferol 3-O- β -rutinosido (Isómero 2)	8.015 \pm 0.037	593.151	0.9	6.8	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	
11	Ácido fenólico	Ácido 3,5-Dicafeilquinico	8.290 \pm 0.172	515.12	5.3	19.6	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	
12	Flavonol	Quercetina ramnosido (Isómero 1)	8.171 \pm 0.057	447.093	1.1	5.1	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	
13	Ácido fenólico	Ácido 3-feruloiquinico (Isómero 2)	8.239 \pm 0.038	367.103	0.8	5.3	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	
14	Flavona	Apigenina 8-C- α -L-arabinosido 6-C- β -D-glucosido (Isómero 2)	8.724 \pm 0	563.141	0.1	15.7	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄	

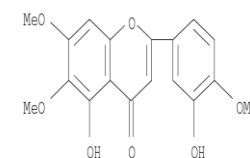
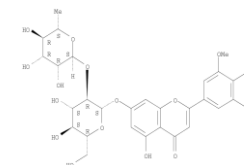
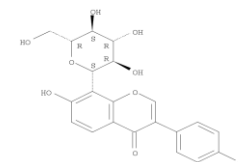
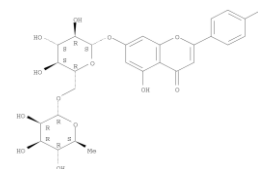
15	Ácido fenólico	2-O-trans-feruloil	7.817±0.045	383.061	2.1	5.9	C ₁₆ H ₁₅ O ₁₁	
16	Flavonol	Canferol 3-O-α-L-ramnopiranosil-(1→6)-β-D-galactopiranosil 7-O-α-L-ramnopiranosido	8.574±0	739.209	1.2	3.6	C ₃₃ H ₃₉ O ₁₉	
17	Flavonol	Canferol 3-O-ramnosido 7-O-ramnosido	8.638±0.083	577.156	2.5	6.4	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄	
18	Flavona	Ácido β-D-Glucopiranosiduro nico	8.899±0.022	681.131	0.3	4	C ₂₉ H ₂₉ O ₁₉	
19	Flavonol	Canferol 3-O-ramnosido 7-O-ramnosido (Isómero 2)	8.966±0.148	577.156	1.6	6.2	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄	
20	Ácido fenólico	Sinapoil glucosido	9.126±0	385.114	0.2	4.6	C ₁₇ H ₂₁ O ₁₀	
21	Flavonol	Quercetina rutinosido (Isómero 2)	9.122±0.046	609.146	0.6	4.3	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	

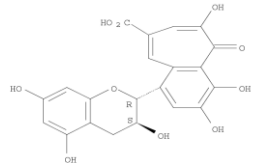
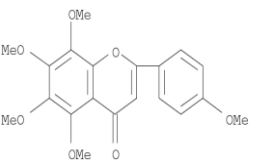
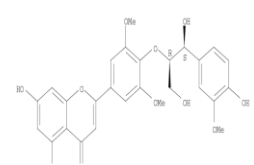
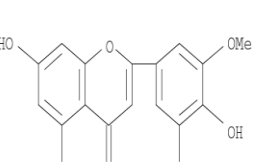

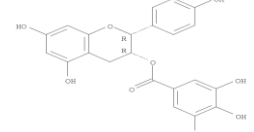
22	Flavona	Apigenina 7-O-glucosido	9.273±0.043	431.098	1.5	6.6	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	
23	Flavonol	Canferol 3-O-ramnosido 7-O-ramnosido (Isómero 3)	9.382±0.039	577.156	0.1	8.5	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄	
24	Flavona	Mirificina	9.661±0.025	547.146	0.9	8.2	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₃	
25	Flavonol	Quercetina 3-galactosido	9.705±0.061	463.088	0.5	9.4	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	
26	Flavonol	Canferol 3-O-β-rutinosido (Isómero 3)	9.977±0.036	593.151	0.3	5.2	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	
27	Flavonol	Canferol 3-O-ramnosido 7-O-ramnosido (Isómero 4)	10.129±0.019	431.098	0.2	5	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	
28	Flavonol	Isoramnetina 3-O-B-rutinosido	10.102±0.042	623.162	0.8	8.3	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₆	

29	Flavona	Isoscutelareina 7-O-(2''-O-6'''-O-acetil-β-D-alopiranosil-β-D-glucopiranosido	10.274±0.008	651.157	2.7	11.1	C ₂₉ H ₃₁ O ₁₇	
30	Flavonol	Canferol 3-O-β-rutinosido (Isómero 4)	10.495±0.032	593.151	0.6	4.4	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	
31	Flavonol	Quercetina ramnosido (Isómero 2)	10.596±0.050	447.093	0.1	8.6	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	
32	Flavonol	Canferol 3-O-β-rutinosido (Isómero 5)	10.752±0.029	593.151	1.2	5	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	
33	Flavona	Maisina	10.831±0.034	575.141	2	5.6	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₄	
34	Flavona	Tricina 7-O-glucosido (Isómero 1)	10.975±0.012	491.12	1.9	3.6	C ₂₃ H ₂₃ O ₁₂	
35	Flavonol	Canferol 3-O-ramnosido 7-O-ramnosido (Isómero)	11.079±0.018	431.098	0.4	1.1	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	
36	Flavona	Tricina 7-O-glucosido (Isómero 2)	11.528±0.030	491.12	1.5	1.6	C ₂₃ H ₂₃ O ₁₂	

37	Flavona	Apimaisina (Isómero 1)	11.662±0.126	559.146	1.4	15.7	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₃	
38	Flavonol	Canferol 3-O-ramnosido 7-O-ramnosido (Isómero)	11.740±0.016	431.098	0.1	2.8	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	
39	Flavona	Apimaisina (Isómero 2)	12.197±0.338	559.146	1.3	10.3	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₃	
40	Flavona	Diosmetina 7-O-ramnosil(1→6)-glucósido (Isómero 1)	11.874±0.16	607.167	0.7	2.3	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₅	
41	Flavona	6''-Acetylapiina	12.481±0.023	605.151	1.6	12.3	C ₂₈ H ₂₉ O ₁₅	
42	Flavona	Tricina 4'-O-(erithro-β-guaiacilgliceril) ether 7-O-glucopiranosido (Isómero 1)	12.588±0.023	687.193	0.6	10.3	C ₃₃ H ₃₅ O ₁₆	
43	Flavona	Diosmetina 7-O-ramnosil(1→6)-glucósido (Isómero 2)	12.681±0.019	607.167	0.6	9.3	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₅	

44	Flavona	Tricina 4'-O-(eritro-β-guaiacilgliceril) eter 7-O-glucopiranosido (Isómero 2)	13.069±0.035	687.193	1	10.9	C ₃₃ H ₃₅ O ₁₆
45	Flavona	Tricina 4'-O-(eritro-β-guaiacilgliceril) eter 7-O-glucopiranoside (Isómero 3)	13.385±0.343	687.193	1.7	2.8	C ₃₃ H ₃₅ O ₁₆
46	Flavona	Acacetina-7-O-β-D-rutinosido	13.335±1.242	591.172	0.5	4.9	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₄
47	Isoflavona	Daidzeina 8-C-glucósido	14.482±0	415.103	1	3.4	C ₂₁ H ₁₉ O ₉
48	Flavona	Tricina 7-O-neohesperidosido	14.766±0	637.177	2.2	6.4	C ₂₉ H ₃₃ O ₁₆
49	Flavona	5,3'-Dihidroxi-6,7,4'-trimetoxiflavona	15.319±0	343.082	0.6	11.6	C ₁₈ H ₁₅ O ₇



50	Teaflavina	Acido teaflavico	15.832±0.041	427.067	0.7	9.5	C ₂₁ H ₁₅ O ₁₀	
51	Flavona	4',5,6,7,8-Pentamethoxiflavona (Tangeritina)	16.085±0.084	371.114	0.7	5.3	C ₂₀ H ₁₉ O ₇	
52	Flavona	Tricina 4'-O-(erithro-β-guaiacilgliceril) eter (Isomero 1)	17.304±0.051	525.14	0.4	3.8	C ₂₇ H ₂₅ O ₁₁	
53	Flavona	3',5'-O-Dimethyltricetina;	17.450±0.067	329.067	1.8	4	C ₁₇ H ₁₃ O ₇	
54	Flavona	Tricina 4'-O-(erithro-β-guaiacilgliceril) eter (Isomero 2)	18.331±0.054	525.14	0.5	5.3	C ₂₇ H ₂₅ O ₁₁	
55	Flavanol	Epicatequina 3-O-galato	21.581±0.025	441.083	0.3	6.5	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₀	

Algunos compuestos se encontraron únicamente en una población, como el **16** y el **48** solo presentes en el tejido foliar de la población G3 (*Z. luxurians*), y como el **16** y el **20**, solo presentes en el de la población 692 (*Z. diploperennis*). Otros, como los compuestos **18**, **28**, y **42** estuvieron ausentes de las muestras de las poblaciones 692 y G3, 692 y 694, y G3, respectivamente.

De acuerdo a los resultados de la composición fenólica, las hojas de las poblaciones silvestres de teocintle tienen un número mayor y una diversidad más alta de compuestos que su respectivo polen.

Una de las principales funciones de los flavonoides en las plantas es protección contra radiación UV, impidiendo sus efectos nocivos en los tejidos internos y la defensa ante el herbivorismo. En este análisis se encontraron dos compuestos, los cuales fueron los que se acumularon en mayor cantidad en los tejidos foliares de *Zea*, el ácido cloragénico (**1**, **3**, y **4**) y el compuesto **33**, una flavona llamada maisina (Tabla 8 y Figura 10). Elliger *et al.* (1980a) la describieron como una flavona C-glicosido, presente en los estigmas de maíz de la raza Zapalote Chico, la cual inhibe el crecimiento y el desarrollo larvario del gusano de la mazorca del maíz (*Heliothis zea*); el nombre químico de la maisina, determinado por esos mismos autores fue 2"-O- α -L-ramnosil-6-C-(6-desoxi-xilo-hexos-4-ulosa)-luteolina.

Diferentes flavonoides confieren resistencia a los ataques de insectos en varias especies de plantas. Las flavonas O-glicosidos y las flavonas agliconas son compuestos importantes en contra del desarrollo de *Heliothis virescens*, *H. zea* y *Pectinophora gossypiella* en capullos de plantas de algodón, y los taninos contra el ataque de insectos en roble (Elliger *et al.*, 1980b).

Snook *et al.* (1989) encontraron niveles más altos de maisina en los estigmas de maíz de la raza Zapalote Chico y en los de un teocintle anual (*Zea mays* ssp. *mexicana*) que en líneas de maíz resistente al gusano de la mazorca y al gusano cogollero; el maíz Zapalote Chico presentó un nivel relativo del contenido de maisina de 6.30 % del peso seco, el teocintle de 5.49 %, y las líneas mejoradas de maíz variaron del 3.72 al 0.01% en su contenido de maisina.

Gueldner *et al.* (1991) mencionan que la maisina también se encuentra en las hojas de maíz, teocintle y la especie de pasto *Eremochloa ophiuridae*, todas las cuales son

resistentes a las dos principales plagas de insectos de maíz (gusano cogollero y gusano de la mazorca) en el sureste de Estados Unidos, plagas que se alimentan en el verticilo de las plantas de maíz, ya que en esa parte de la planta, la acumulación de maisina es baja, contrariamente a los niveles en los que se acumula ese compuesto en las puntas de las hojas que crecen justo debajo de donde nace el fruto.

Posteriormente se reportó que además de la maisina, el ácido cloragénico, que fue encontrado como componente foliar en todas las muestras de *Zea* analizadas en este trabajo (Tabla 8), también inhibe el desarrollo del gusano cogollero y el gusano de la mazorca; esa propiedad de la maisina y del ácido cloragénico se le atribuye a la presencia de un grupo o-dihroxilo, en ambos compuestos (Gueldener *et al.*, 1992). En ese mismo trabajo se analizaron muestras de hoja y de estigmas de plantas de maíz, encontrando mayor concentración de maisina en hoja (2.21 a 0.06%) que en estigmas (0.320 a 0.0565). En el presente trabajo la presencia de maisina se detectó en todas las poblaciones analizadas de tejido foliar de *Zea*, la concentración relativa de este compuesto vario de 4 a 2.8, y la del ácido cloragénico varió de 4 a 1.7.

Por la importancia de la maisina como sustancia de defensa contra el ataque de plagas importantes del maíz, se han realizado trabajos relacionados a la regulación de la expresión de ese compuesto. Goettel y Messing (2010) investigaron sobre los genes duplicados p1 y p2 en el maíz, ya que ambos genes codifican un factor de transcripción implicado en la síntesis de maisina, además el gen p1 también controla la acumulación de pigmentos rojizos en tejidos florales.

Otros compuestos que fueron reportados en plantas de maíz fueron los compuestos 2-O-trans-cafeoil y 2-O-trans-feruloil por Ozawa *et al.*(1977); esos autores mencionan que los esteres fenólicos son compuestos nuevos que no habían sido reportados previamente; el rol fisiológico de estos esteres en los tejidos de las plantas es incierto aun. Estos dos compuestos 2-O-trans-cafeoil (compuesto 2 y 8) y 2-O-trans-feruloil (Compuesto 15) fueron encontrados en casi todos los tejidos foliares de las plantas de *Zea* analizados en el presente estudio.

Entre los trabajos realizados en especies que pertenecen a la misma familia que el género *Zea* se encuentra el de Jiao *et al.* (2007), en hojas de bambú, quienes

reportan el compuesto 3',5'-O-dimetiltricetina. Este compuesto fue encontrado en el tejido foliar de todas las poblaciones de *Zea* analizadas en el presente estudio. Otros dos compuestos que no habían sido reportados previamente para el género *Zea* pero sí para la familia Poaceae son los compuestos diastereoisómeros tricina-4'-O-(eritro- β -guaiacilgliceril)-éter-7-O-glucopiranosido, tricina-4'-O-(treo- β -guaiacilgliceril)-éter-7-O-glucopiranosido, tricina-4'-O-(eritro- β -guaiacilgliceril)-éter, y tricina-4'-O-(treo- β -guaiacilgliceril)-éter (Bouaziz *et al.*, 2002); esos mismos autores realizaron un trabajo en hojas de *Hyparrhenia hirta* donde encuentran las cuatro formas isoméricas y reportan que 7-O-glucosidos son los primeros glucósidos de flavonas que se encuentran como producto natural. En el presente trabajo fueron encontrados ambos compuestos en forma eritro (tricina-4'-O-(eritro- β -guaiacilgliceril)-éter-7-O-glucopiranosido y tricina-4'-O-(eritro- β -guaiacilgliceril)-éter) (Tabla 8). Los trabajos de Colombo *et al.*(2006) y Vila *et al.*(2008) en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) reportan esos compuestos diastereoisómericos en hojas, así como también otros tres compuestos que coinciden con los encontrados en el presente trabajo en algunas poblaciones de *Zea*, como la tricina-7-O-neohesperidosido (compuesto 48), tricina-7-O-glucosido (compuestos 22 y 34), y apigenina-8-C- α -L-arabinosido-6-C- β -D-glucosido (compuestos 9 y 14). Estos compuestos tricina-4'-O-(eritro- β -guaiacilgliceril)-éter, y tricina-4'-O-(treo- β -guaiacilgliceril)-éter diastereoisómeros también fueron reportados por primera vez para sorgo (*Sorghum halepense*) por Huang *et al.* (2010).

Uno de los más recientes estudios sobre compuestos fenólicos de especies de poaceas es el de Mohanlal *et al.* (2012), quienes realizaron un estudio en una variedad de arroz asiático (*Oryza sativa* L. var. Njavara); esos autores presentan estudios citotóxicos que revelan por primera vez que la tricina-4'-O-(eritro- β -guaiacilgliceril)-éter, y la tricina-4'-O-(treo- β -guaiacilgliceril)-éter inducen apoptosis en tres líneas celulares de cáncer.

Para el análisis fenético de cluster se elaboró una matriz de datos considerando la presencia/ausencia de cada uno de los 55 compuestos encontrados vs. cada una de las poblaciones analizadas. El dendrograma obtenido a partir de ese análisis se muestra en la Figura 11, donde se puede observar la formación de tres grupos

principales A, B y C. En el primer grupo se agrupan todas las poblaciones de la raza Balsas pertenecientes a la misma subespecie (*parviglumis*) en este mismo grupo A se agrupó la población G3 (*Z. luxurians*).

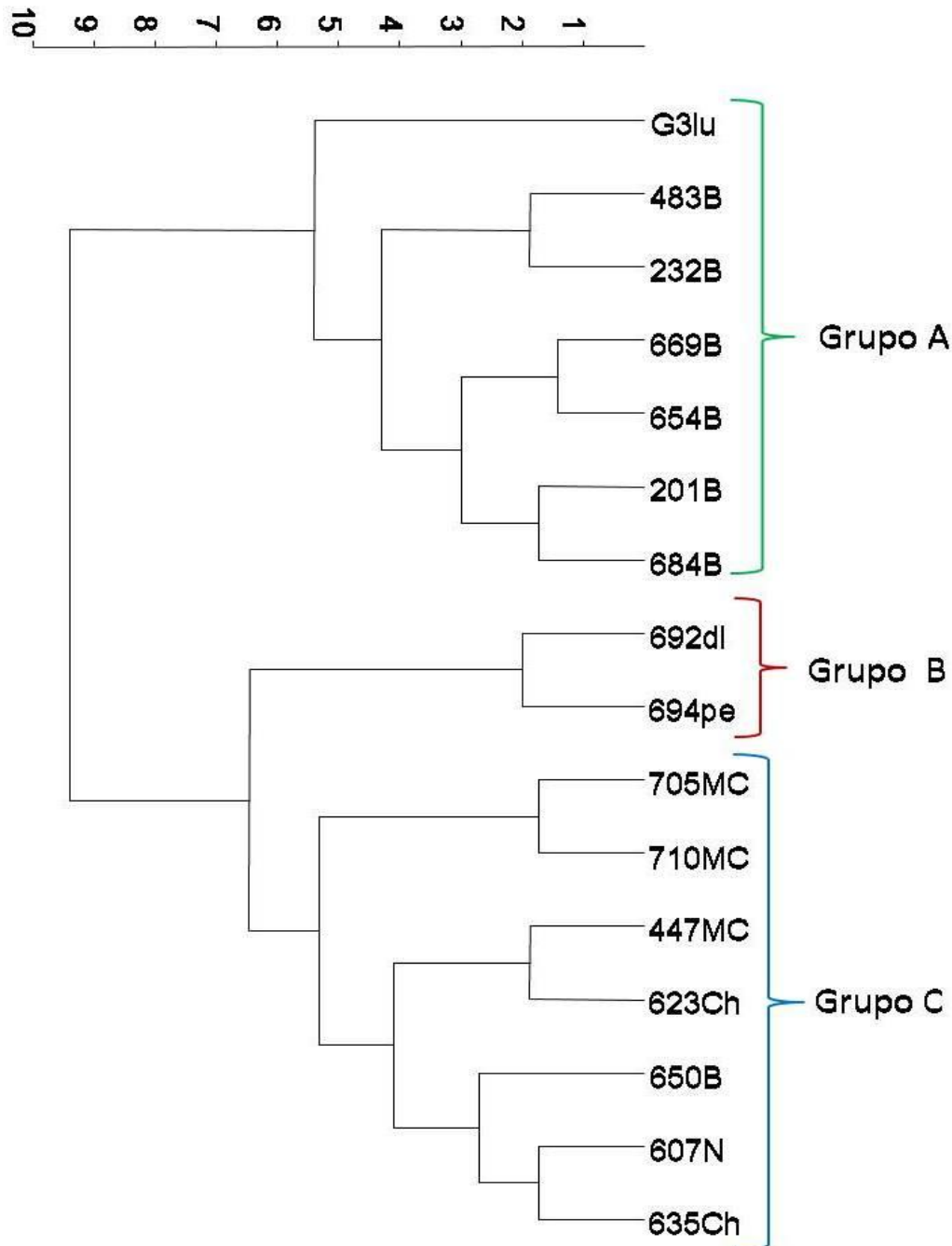


Figura 11. Agrupamiento de las diferentes poblaciones de Zea de acuerdo a sus perfiles fenólicos foliares (B= raza Balsas, MC= raza Mese Central, Ch= raza Chalco, N= raza Nabogame, lu= *Z. luxurians*, di= *Z. diploperennis*, pe= *Z. perennis*).

En el segundo grupo B se agruparon las poblaciones 692 (*Z. diploperennis*) y 694 (*Z. perennis*) ambas pertenecientes a la sección *Luxuriantes*. En el grupo C se agruparon las poblaciones pertenecientes a la subespecie *mexicana*, sin embargo una población de la raza Balsas (650) se incluyó dentro de este grupo.

Los resultados de la composición fenólica foliar obtenidos en el presente trabajo apoyan parcialmente la división actual del género *Zea*, que ha sido aceptada por varios autores (Doebley e Iltis, 1980; Iltis y Doebley, 1980; Doebley, 1990; Iltis y Benz, 2000; Sánchez *et al.*, 2011). Sin embargo la sección *Luxuriantes* propuesta por Doebley e Iltis (1980) no es apoyada, ya que la especie que la población G3 (*Z. luxurians*) se ubicó fuera del grupo B donde se encuentran *Z. perennis* y *Z. diploperennis*, las otras dos especies de la sección *Luxuriantes*. El perfil fenólico de hoja de la población G3 sugiere una relación más cercana entre *Z. luxurians* y la raza Balsas ssp. *parviglumis*, que con *Z. perennis* y *Z. diploperennis*.

Tiffit y Gaut (2001) también reportaron una relación más estrecha entre *Z. luxurians* y ssp. *parviglumis* que entre *Z. luxurians* y *Z. perennis* y *Z. diploperennis*, utilizando la variabilidad de secuencias de ADN en cuatro loci nucleares. Zimmer *et al.* (1988), Purugganan y Wesler (1994), Buckler y Holstsford (1996), y Tiffin y Gaut (2001) basándose en varios tipos de datos moleculares, proponen que la sección *Luxuriantes* no es un grupo natural. Los resultados del presente trabajo representan fundamentos químicos para apoyar la propuesta hecha por estos autores.

Los perfiles fenólicos foliares también han sido utilizados en estudios de otras especies de Poaceae, como el de Herrera y Bain (1991), quienes reportaron 22 flavonoides encontrados en las hojas del complejo de *Muhlenbergia montana* (Poaceae), riqueza de compuestos fenólicos que fue menor a la encontrada para las hojas de *Zea* en el presente trabajo. Herrea y Bain (1991) encontraron patrones de flavonoides distintos para todas las especies perennes y patrones idénticos para dos especies anuales; el análisis fenético conforme a los compuestos encontrados revelaron que no es compatible la inclusión de dos especies anuales, *Muhlenbergia crispiseta* y *Muhlenbergia peruviana*, como parte del complejo *Muhlenbergia montana*. Los perfiles fenólicos de hoja encontrados en los taxa de *Zea* analizados permitieron discriminar dos especies de la sección *Luxuriantes* (*Z. perennis* y *Z.*

diploperennis), ubicándolas en un grupo separado de otros dos grupos, cada uno incluyendo *Z. mays* ssp. *mexicana* y a *Z. mays* ssp. *parviglumis*, permitieron también diferenciar entre estas dos últimas. La pertenencia de *Z. luxurians* a la sección *Luxuriantes*, no fue sustentada (Figura 11), como tampoco lo fue con los perfiles fenólicos de polen ni con los marcadores RAPD.

VI. CONCLUSIONES

Los marcadores RAPDs representan una herramienta accesible en términos económicos y prácticos para el análisis de la variabilidad genética de *Zea*.

El número de bandas amplificadas (47) con los dos marcadores RAPD (OPA10 y OPA20) fueron todas polimórficas.

La variabilidad genética de las poblaciones de *Zea* analizadas, detectada por los marcadores RAPD OPA10 y OPA20 fue baja, en relación a otros marcadores como las izoenzimas, SSRs, y otros iniciadores RAPD.

Las secuencias que los marcadores OPA10 y OPA20 amplifican probablemente correspondan a secuencias conservadas (de baja variabilidad) de los genomas de *Zea*.

Los perfiles de amplificación RAPDs para este trabajo, no permitieron discriminar claramente entre las diferentes especies y subespecies de *Zea*, ni entre las dos secciones del género.

Los iniciadores OPA10 y OPA20 generaron perfiles de amplificación con una tendencia población-específica, por lo que podrían ser valiosos para la tipificación de poblaciones de teocintle.

Esos mismos iniciadores agrupan las diferentes poblaciones de teocintles analizadas en grupos que corresponden a diferentes regiones geográficas.

El polen de las poblaciones silvestres de *Zea* son ricas en compuestos fenólicos (19 fenoles), sobre todo en flavonoles glicósidos derivados de quercetina e isoramnetina. Seis compuestos principales (Quercetina-3-O-glucosido-7-O-glucosido, Quercetina-3-soforosido-7-glucosido, Quercetina-3,3'-O-diglucosido, Isoramnetina-3-O-gentiobiosido, Quercetina rutinosido, Quercetina-3-galactosido) estuvieron presentes en el polen de todas las muestras analizadas. Los perfiles fenólicos de polen fueron muy semejantes para todas las poblaciones, al igual que la tendencia de acumulación, y solamente diferencias en la presencia de compuestos menores, permitieron discernir cierto grado de variabilidad en el género.

El análisis fenético de los perfiles fenólicos de polen no hizo una separación clara de las ssp. *mexicana* y ssp. *parviglumis*, ya que ambas presentaron perfiles polínicos iguales. Estos resultados no concuerdan con la división actual de la especie *Zea mays*. Tampoco apoyan la división del género en las dos secciones reconocidas, ya que *Z. luxurians*, ubicada actualmente en la sección *Luxuriantes*, se agrupó con ssp. *mexicana* y ssp. *parviglumis*, en vez de con las otras dos especies (*Z. perennis* y *Z. diploperennis*) ubicadas en esa sección.

El tejido foliar de todas las poblaciones silvestres de *Zea* presenta una mayor diversidad química que el polen. Del total (55) de los compuestos foliares, los derivados glicósidos de flavonas, principalmente de apigenina y tricina, fueron los predominantes. Entre los componentes foliares resaltan la maisina y el ácido cloragénico, dos compuestos importantes por su toxicidad a insectos plaga del maíz. Esos perfiles presentaron mayor diversidad que los de polen, aunque la tendencia de acumulación fue igual para todas las muestras. Diecinueve de esos compuestos estuvieron presentes en el tejido foliar de todas las poblaciones.

El perfil fenólico de hoja presentó más variabilidad existente que el polen, por lo que el análisis fenético de los perfiles permitió discriminar entre las dos subespecies de la sección *Zea*, ya que tanto ssp. *parviglumis* y ssp. *mexicana* formaron grupos separados, lo que concuerda con lo reportado por varios autores para esa sección del género *Zea*. Sin embargo este análisis no apoya claramente el reconocimiento de la sección *Luxuriantes*, apoyando la propuesta de que esa sección no es un grupo natural, ya que en los resultados del análisis fenético *Zea luxurians* se agrupó con ssp. *parviglumis* en vez de con *Z. perennis* y *Z. diploperennis*, las otras dos especies de la sección *Luxuriantes*, que sí formaron un solo grupo.

Los perfiles fenólicos foliares por tener mayor variabilidad química pueden ser una herramienta importante y pueden utilizarse como marcadores quimiotaxonómicos para este género.

VII. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

Durante la realización del presente trabajo se han abierto posibilidades para trabajos futuros, los cuales podrían incluir estudios fitoquímicos más complejos en tejidos foliares de teocintles para poder determinar actividades biológicas de cada uno de los compuestos encontrados. Debido a la gran riqueza de compuestos fenólicos encontrados en el tejido foliar de las poblaciones silvestres de teocintle, sería importante realizar estudios para incorporar algunos de esos caracteres químicos (importantes por su actividad antioxidante y por conferir resistencia contra el ataque de insectos) en nuevas variedades de maíz. Continuar realizando investigaciones sobre los compuestos químicos del polen de teocintles resultaría también importante, ya que los compuestos mayoritarios (glicósidos de quercetina) tienen una gran actividad biológica como antioxidantes.

El uso de un número mayor de marcadores moleculares, incluyendo también un número mayor de individuos por población sería relevante para estudios de variabilidad genética que contemplara estimaciones de identidad genética, distancia genética, flujo génico, y coeficiente de diferenciación, para poder hacer propuestas de límites específicos dentro del género *Zea*.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almaraz-Abarca**, N., M.S. González-Elizondo, J.A. Tena-Flores, J.A. Ávila-Reyes, J. Herrera-Corral, N. Naranjo-Jiménez. 2006. Foliar flavonoids distinguish *Pinus leiophylla* and *Pinus chihuahuana* (Coniferales: *Pinaceae*). Proc. Biol. Soc. Wash. 119: 426-439.
- Almaraz- Abarca**, N., J.A. Ávila-Reyes, J. Herrera-Corral, N. Naranjo-Jiménez, L.S. González-Valdéz, R. González-Laredo. 1998. The feeding deterrent effect of a flavonol and a flavonone on the mexican bean beetle (*Epilachnia varivestis mulsant*). Ufamari. Revista Hispanoamericana de Ciencia y Tecnología 44: 33-42.
- Almaraz-Abarca**, N., E.A. Delgado-Alvarado, V. Hernández-Vargas, M. Ortega-Chávez, G. Orea-Lara, A. Cifuentes-Díaz de León, J.A. Ávila-Reyes, R. Muñiz-Martínez. 2009. Profiling of phenolic compounds of somatic and reproductive tissues of *Agave durangensis* Gentry (Agavaceae). Am. J. Applied Sci. 6: 1076-1085
- Almaraz-Abarca**, N., M.G. Campos, A. Delgado-Alvarado, J.A. Ávila-Reyes, J. Herrera-Corral, L.S. González-Valdez, N. Naranjo-Jiménez, C. Frigerio, A.F. Tomatas, A.J. Almeida, A. Vieira, J.N. Uribe-Soto. 2008. Pollen flavonoid/ phenolic acid composition of four species of Cactaceae and its taxonomic significance. Am. J. Agric. Biol. Sci., 3: 534- 543.
- Almaraz-Abarca**, N., M.G. Campos, J.A. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Jiménez, J. Herrera-Corral, L.S. González-Valdez. 2004. Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. Interciencia 29: 574-578
- Almaraz-Abarca**, N.; M.G. Campos, A. Delgado-Alvarado, J.A. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Jiménez, J. Herrera-Corral, A.F. Tomatas, A.J. Almeida, A. Vieira.

2007. Fenoles del polen de *Stenocactus*, *Echinocereus* y *Mammillaria* (Cactaceae). Polibotánica 23: 37-55

Andersen, J.R., I. Zein, G. Wenzel, B. Krützfeldt, J. Eder, M. Ouzunova, T. Lübberstedt. 2007. High levels of linkage disequilibrium and associations with forage quality at a Phenylalanine ammonia-Lyase locus in European maize (*Zea mays* L.) inbreds. Theor. Appl. Genet. 114: 307-319.

Aoki, H., N. Kuze, Kato. 2002 Anthocyanins isolated from purple corn (*Zea mays* L.) Foods Food Ingredients J. Jpn. 199: 41-45.

Ayres, D.R., D. Garcia-Rossi, H.G. Davis, D. R. Strong. 1999. Extent and degree of hybridization between exotic (*Spartina alterniflora*) and native (*S. foliosa*) cordgrass (Poaceae) in California, USA determined by random amplified polymorphic DNA (RAPDS). Mol. Ecol 8: 1179-1186

Ayres, D.R., D.R. Strong. 2001. Origin and genetic diversity of *Spartina anglica* (Poaceae) using nuclear DNA markers. Amer. J. Bot. 88: 1863-1867

Bartlett, E., S.J. Novak, R.N. Mack. 2002. Genetic variation in *Bromus tectorum* (Poaceae): differentiation in the eastern United States. Amer. J. Bot. 89: 602-612.

Benz, B.F., L.R. Sánchez V, F.J. Santana M. 1990. Ecology and ethnobotany of *Zea diploperennis*: preliminary investigations. Maydica 35: 85-98.

Bouaziz, M., N.C. Veitch, R.J. Grayer, M.S.J. Simmonds, M. Damak. 2002. Flavonolignans from *Hyparrhenia hirta*. Phytochemistry. 60: 515-520.

Bravo, L. 1998. "Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance". Nutr. Rev. 56: 317-333.

Buckler, E.S., T.P. Holtsford. 1996. *Zea* systematic: ribosomal ITS evidence. Mol. Biol. Evol. 13: 612-622.

- Campos, M.G y K.R. Markham.** 2007. Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: Flavones, Flavonols and Phenolic Acids. Impresa da Universidad de Coimbra, pp.119.
- Campos, M.G., R.F. Webby, K.R. Markham.** 2002. The unique occurrence of the flavones aglycone triclin in Myrtaceae pollen. *Zeitschrift für Naturforsch* 57c: 944-946.
- Campos, R.M. G.** 1997. Caracterização do Pólen Apícola Pelo seu Perfil em compostos Fenólicos e Pesquisas de Algumás Actividades Biológicas. Tesis de Doutoramento, Universidad de Coimbra, Portugal.
- Carey, C.C., J.T. Strahle, D.A. Selinger, V.L. Chandler.** 2004. Mutations in the pale aleurone color 1 regulatory gene of the *Zea mays* anthocyanin pathway have distinct phenotypes relative to the functionally similar TRANSPARENT TESTA GLABRA1 gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 16: 450-464.
- Casati, P. y V. Walbot.** 2003. Gene expression profiling in response to ultraviolet radiation in maize genotypes with varying flavonoid content. *Plant Physiol*. 132: 1739-1754.
- Ceska, O. y E.D. Styles.** 1984. Flavonoids from *Zea mays* pollen. *Phytochemistry* 23: 1822-1823.
- Colombo, R., J.H. Yariwake, E.F. Queiroz, K. Ndjoko, K. Hostettmann.** 2006. On-line identification of further flavones C- and O-glycosides from sugarcane (*Saccharum officinarum* L., Gramineae) by HPLC-UV-MS. *Phytochem. Anal.* 17: 337-343.
- Darraq, A., J. Varré, P. Touzet.** 2010. A scenario of mitochondrial genome evolution in maize based on rearrangement events. *BMC Genomics* 11: 233.
- De La Cruz, L. L.** 2007. Sistemas de Incompatibilidad Genética En Maiz y Teocintle. (*Zea spp.*) en México. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias

Agrícolas y Forestales. Centro universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. México.

De Pascual-Teresa, S., C. Santos-Buelga, J.C. Rivas-Gonzalo. 2002. LC-MS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *J. Sci. Food Agric.* 82: 1003-1006.

Delalonde, M., Y. Barret, M.P. Coumans. 1996. Development of phenolic compounds in maize anthers (*Zea mays*) during cold pretreatment prior to androgenesis. *J. Plant Physiol.* 149: 612-616.

Dermastia, M., A. Kladnik, J.D. Koce, P.S. Chourey. 2009. A cellular study of Teosinte *Zea mays* subsp. *parviglumis* (Poaceae) caryopsis development showing several processes conserve in maize. *Amer. J. Bot.* 96: 1798-1807

Doebley, J.F. 1990a. Molecular systematic of *Zea* (Gramineae). *Maydica* 35: 143-150.

Doebley, J.F. 1990b. Molecular evidence and the evolution of maize. *Econ. Bot.* 44: 6-27.

Doebley, J.F. 2003. The Morphology of Maize and Teosinte. Laboratory of Genetics. University of Wisconsin-Madison. <http://teosinte.wisc.edu/index.html> consultada 14 de junio de 2012.

Doebley, J.F. 2004. The genetics of maize evolutions. *Annu. Rev. Genet.* 38: 37-59

Doebley, J.F. y H.H. Iltis. 1980. Taxonomy of *Zea* (Gramineae). I. A Subgeneric classification with key to taxa. *Amer. J. Bot.* 67: 982-993.

Doebley, J.F., W. Renfroe, A. Blanton. 1987. Restriction site variation in the *Zea* chloroplast genome. *Genetics* 117: 139-147.

- Elliger**, C.A., B.G. Chan, A.C. Waiss Jr, R.E. Lundin, W.F. Haddon. 1980a. Phytochemistry. 19: 293-297.
- Elliger**, C.A., B.G. Chan, A.C. Waiss Jr. 1980b. Flavonoids as larval growth inhibitors. Naturwissenschaften. 67: 358-360.
- Eschholz**, T.W., P. Stamp, R. Peter, J. Leipner, A. Hund. 2010. Genetic structure and history of Swiss maize (*Zea mays* L. ssp. *mays*) landraces. Genet. Resour. Crop. Evol. 57: 71-84
- Esselman**, E.J., L. Jianqiang, D.J. Crawford, J.L. Winduss, A.D. Wolfe. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. Mol. Ecol. 8: 443-451.
- Ferreres**, F., D.M. Pereira, P. Valentão, P.B. Andrade. 2010. First report of non-coloured flavonoids in *Echium plantagineum* bee pollen: differentiation of isomers by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. Rapid. Commun. Mass Spectrum. 24: 801-806.
- Forkmann**, G. 1994. Genetics of flavonoids. En: The Flavonoids. Advances in Research since 1986. (Ed. J.B. Harborne). Chapman & Hall. London, pp. 537-564.
- Fossen**, T., R. Slimestad, O.M. Anderson. 2001. Anthocyanins from maize (*Zea mays*) and reed canarygrass (*Phalaris arundinacea*). J. Sci. Agric. Food Chem. 49: 2318-2321.
- Francisco-Ortega**, J., D. Crawford, A. Santos-Guerra, J. Carvalho. 1996. Isozyme differentiation in the endemic genus *Argyranthemum* (Asteraceae: Anthemidae) in the Macaronesian Islands. Plant. Syst. Evol. 202: 37-152.

- Fukunga**, K., J. Hill, Y. Vigouroux, Y. Matsuoka, G.J. Sánchez, K. Liu, E.S. Buckler, J. Doebley. 2005. Genetic diversity and population structure of teosinte. *Genetics* 169: 2241-2254
- Goettel**, W. y J. Messing. 2010. Divergence of gene regulation through chromosomal rearrangements. *BMC Genomics*. 11: 678.
- Graur**, D., W.H. Li. 2000. *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates. Massachusetts, pp.481.
- Guedner**, R.C., M.E. Snook, B.R. Wiseman, N.W. Widstrom, D.S. Himmelsbach, C.E. Costello. 1991. Maysin in corn, teosinte, and centipede grass. En: *Naturally Occurring Pest Bioregulators*. (Ed P.A. Hedin) ACS Symposium. Series Vol.449. Washintong, DC, pp. 251-263.
- Guedner**, R.C., M.E. Snook, N.W. Widstrom, B.R. Wiseman. 1992. TLC Screen for maysin, chlorogenic acid, and other possible resistance factors to the fall armyworm and the corn earworm in *Zea mays*. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1211-1213.
- Hadacek**, F. 2002. Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21: 273-322.
- Hammer**, O., D.A.T. Harper, P.D. Ryan. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia electronic*. <http://folk.uio.no/ohammer/past/>. Fecha de obtención Febrero de 2011.
- Harborne**, J.B. 1989. General procedures and measurement of total phenolics. En: *Methods in plant biochemistry. Plant phenolics* (Eds. Dey, P.M.; J.B. Harborne). Academic Press, London, pp: 1-28.
- Harborne**, W. y L. Tuner. 1984. *Plant chemosystematics*. Academic Press. London.

- Heller**, W. y G. Forkman. 1994. Biosynthesis of flavonoids. En: The Flavonoids. Advances in Research since 1968 (Ed. J.B. Harborne). Chapman & Hall, London, pp: 499-536.
- Herrera**, A.Y. y J.F. Bain. 1991. Flavonoids of the *Muhlenbergia montana* Complex. Biochem. Syst. Ecol. 19: 665-672.
- Huang**, H., Y. Liu, Q. Meng, S. Wei, H. Cui, C. Zhang. 2010. Flavonolignans and other phenolic compounds from *Sorghum halepense* (L.) Pers. Biochem. Syst. Ecol. 38: 656-658.
- Ilitis**, H.H. y B.F. Benz. 2000. *Zea nicaraguensis* (Poaceae), a new teosinte from pacific coastal Nicaragua. Novon. 10: 382-390
- Ilitis**, H.H. y J.F. Doebley. 1980. Taxonomy of *Zea* (*Gramineae*) II. Subspecific categories in the *Zea mays* complex and a generic synopsis. Amer. J. Bot. 67: 994-1004.
- Jiao**, J., Y. Zhang, C. Liu, J. Liu, X. Wu, Y. Zhang. 2007. Separation and purification of triclin from an antioxidant product derived from bamboo leaves. J. Agric. Food Chem. 55: 10086-10092.
- Karp**, A. 2000. Molecular tools for detecting genetic diversity. Acta Hort. 530: 17-29.
- Kato**, Y T.A., C. Mapes S, L.M. Mera O, J.A. Serratos H, R.A. Bye B. 2009. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F.
- Kato**, Y., T.A. 1984. Chromosome morphology and the origin of maize and its races. Evol. Biol. 17: 219-253.
- Kato**, Y., T.A. 1996. Revisión del estudio de la introgresión entre maíz y teocintle. En: Flujo genético entre maíz criollo, maíz mejorado y teocintle:

implicaciones para el maíz transgénico.(Eds J.A. Serratos, M.C. Willcox y F. Castillo) CIMMYT México, D.F, pp.48-57

Kutchan, T.M. 2001. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiol.* 125: 58-60.

Larson, R. L. 1989. Flavonoid 3'-O-methylation by *Zea mays* L. preparation. *Biochem Physiol. Pfl.* 184: 453-460.

Li, A. y S. Ge. 2001. Genetic variation and clonal of *Psammochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR markers. *Ann. Botany.* 87: 585-590.

Mangelsdorf, P.C. 1974. Corn. Its origin, Evolution and Improvement. The Belknap Press. Harvard University. Press. Cambridge, Mass. 262p.

Mangelsdorf, P.C. 1986. The origin of corn. *Sci. Ame.* 25: 72-78.

Mangelsdorf, P.C. y R:G: Reeves. 1959. The origin of corn. III. Modern races, the product of teosinte introgression. *Bot. Mus. Leafl. Harvard University.* 18: 389-411.

Markham, K.R. 1982. Techniques of flavonoid identification. Academic press, London, pp: 1-113.

Markham, K.R. y M. Campos. 1996. 7- and 8-O-methylherbacetin-3-O-sophorosides from bee pollens and some structure/activity observations. *Phytochemistry* 43: 763-767.

Martínez-Palacios, A., L.E. Eguiarte, G.R. Furnier. 1999. Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoria-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. *Ammer. J. Bot.* 86: 1093-1098.

- Matsuoka, Y., Y. Vigouroux, M.M. Goodman, J. Sanchez G., E. Buckler, J. Doebley.** 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Procc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6080-6084.
- Mo, Y., C. Nagel, L.P. Taylor.** 1992. Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7213-7217
- Mohanlal, S., S.K. Maney, T.R. Santhoshkumar, A. Jayalekshmy.** 2012. Tricin 4'-O-(*erythro*- β -guaiacylglyceryl) ether and Tricin 4'-O-(*threo*- β -guaiacylglyceryl) ether isolated from Njavara (*Oryza sativa* L. var. Njavara), induce apoptosis in multiple tumor cells by mitochondrial pathway. *J. Nat. Med.* DOI 10.1007/s1 1418-012-0710-7.
- Montilla, C.E., A. Antezana, P. Winterhalter.** 2008. Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz (*Zea mays*) boliviano. Memorias, Red Alfa Lagrotech, Comunidad Europea, Cartagena.
- Ozawa, T., T. Nishikiori, Y. Takino.** 1977. Three new substituted cinnamoyl hydroxycitric acids from corn plant. *Agric. Biol. Chem.* 41: 359-367.
- Pejic, I., P. Ajmone-Marsan, M. Morgante, V. Kozumplick, P. Castiglioni, G. Taramino, M. Motto.** 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1248-1255.
- Pollak, P.E., K. Hansen, J.D. Astwood, L.P. Taylor.** 1995. Conditional male fertility in maize. *Sex Plant Reprod.* 8: 231-241
- Purugganan, M.D., S.R. Wessler.** 1994. Molecular evolution of *megallan*, a maize Ty3/*gypsy* like retrotransposon. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91: 11674-11678.

- Rentaría, A. M.** 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. En: *Ecología Molecular* (Eds: Eguiarte, E.L., V. Souza, X. Aguirre). Instituto Nacional de Ecología. México, pp: 541-554.
- Ross-Ibarra, J., M. Tenaillon, B.S. Gaut.** 2009. Historical divergence and gene flow in the genus *Zea*. *Genetics*. 181: 1399-1413.
- Rzedowski, G. C. de Rzedowski.** 2001. *Flora Fanerogámica del Valle de México*. 2a. Ed. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán.
- Saghai-Marooif, 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.
- Sambrook, J. y D. W. Russell.** 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3 vol. 3ra ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York, pp. 999.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Sánchez, G. J. J., L. L. De la Cruz, M. V. A. Vidal, P.J. Ron, S. Taba, F. Santacruz-Ruvalcaba, S. Sood, J.B. Holland., C. Ruíz, J. A. Carvajal, C. F. Aragón, T. V. H. Chávez, R. M. M. Morales, R. Barba-González.** 2011. Three new teosintes (*Zea* spp., Poaceae) from Mexico. *Amer. J. Bot.* 98: 1537-1548
- Sánchez, G., J.J., T.A Kato Y., M. Aguilar S., J.M. Hernández C., A. López R y J.A. Ruiz C.** 1998. *Distribución y caracterización del teocintle*. Libro Técnico No. 2 Instituto de Nacional de Investigadores Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).
- Sánchez, G.J.J.** 2011. *Diversidad del Maíz y el Teocintle*. Informe preparado para el proyecto: "Recopilación, generación, actualización y análisis de

información de la acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Manuscrito.

Sánchez, G.J.J. y A. Ruíz C.1996. Distribución del teocintle en México. Campo Experimental Centro de Jalisco. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP).

Schwarz, M., S. Hillebrand, S. Habben, A. Degenhard, P. Winterhalter. 2003. Application of high speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins. *Biochem. Eng. J.* 14: 179-189.

Sears, M.K. y D. Stanley-Horn. 2000. Impact of Bt corn pollen on monarch butterfly populations. En: 6th International symposium on the biosafety f genetically modified organisms (Eds. Fair, G.C., G. Scoles y A. McHughen). University Entension Press.

Sen, A., D. Bergvinson, S.S. Miller, J. Atkinson, R.G. Fulcher, J.T. Arnason. 1994. Distribution and microchemical detection of phenolic acids, flavonoids, and phenolic acid amides in maize kernels. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1879-1883.

Silvertown, J.W. y Charlesworth. 2001. Introduction to plant population biology, Blackwell,Oxford.

Snook, M.E., N.W. Widstrom, R.C. Gueldner. 1989. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of maysin corn silks. *J. Chromatogr.* 477: 439-447.

Sosa, A., R.E.L. de Ruiz, M. del R. Fusco, S.O. Ruiz.1997. Flavonoides y saponinas de estilos y estigmas de *Zea mays* L. (Gramineae). *Acta Farm. Bonaerense* 16: 215-218.

- Sosa**, P. 2003. Conservación genética de endemismos vegetales amenazados de las islas canarias, Proyecto de investigación, Inedito, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Stapleton**, A.E. y V. Walbot. 1994. Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiol.* 105: 881-889
- Taiz**, L. y E. Zeiger. 2008. *Plant Physiology*. Sinauer Associates. Massachusetts.
- Takhtajan**, A.L. 2009. *Flowering Plants*. (2 ed.) Springer, Berlin, Germany.
- Tamagnone**, L., A. Merida, N. Stacy, K. Plaskitt, A. Parr, C.F. Chang, D. Lynn, J. Maxwell, K. Roberts, C. Martin. 1998. Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic tobacco plants. *The Plant Cell* 10: 1801-1816.
- Tao**, W., N. Yang, J. Duan, D. Wu, J. Guo, Y. Tang, D. Qian, Z. Zhu. 2011. Simultaneous determination of eleven major flavonoids in the pollen of *Typha angustifolia* by HPLC-PDA-MS. *Phytochem. Anal.* 22: 455-461.
- Tiffin**, P. y B.S. Gaut. 2001. Sequence diversity in the tetraploid *Zea perennis* and the closely related diploid *Z. diploperennis*: insights from four nuclear loci. *Genetics* 158: 401-412
- Timothy**, D.H., C.S. Levings, D.R. Pring, M.F. Conde, J.L. Kermicle. 1979. Organelle DNA variation and systematic relationship in the genus *Zea*: teosinte. *Procc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4220-4224.
- Van Heerwaarden**, J., J. Ross-Ibarra, J. Doebley, J.C. Glaubitz, J.J. Sánchez G, B.S. Gauts, L.E. Eguiarte. 2010 Fine scale genetic structure in the wild ancestor of maize (*Zea mays* ssp. *parviglumis*). *Mol Ecol* 19: 1162–1173.
- Van Sumere**, C.F. 1989. Phenols and phenolic acids. En: *Methods in Plant Biochemistry*. Vol 1. Academic Press, pp. 29-73

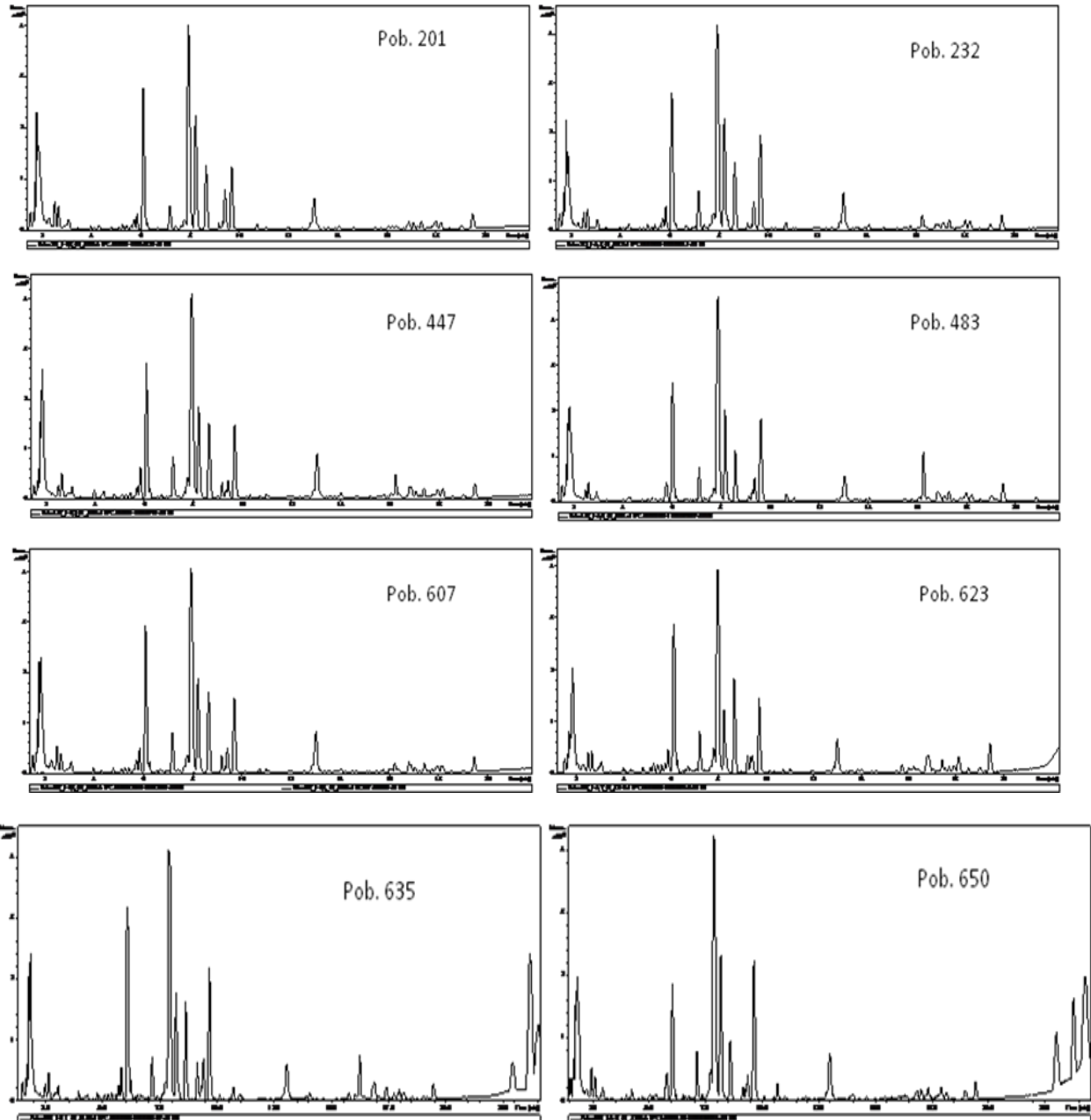
- Veit, M., C. Beckert, C. Hönhe, K. Bauer, H. Geiger.** 1995. Intraspecific and intraspecific variation of phenolic in the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*. *Phytochemistry*. 38: 881-891.
- Vila, F.C., R. Colombo, T. O.de Lira, J.H. Yariwake.** 2008. HPLC microfraction of flavones and antioxidant (radical scavenging) activity of *Saccharum officinarum* L. *J. Braz. Chem. Soc.* 19: 903-908.
- Wang, P., Y. Lu, M. Zheng, T. Rong, Q. Tang.** 2011. RAPD and internal transcribed spacer sequence analyses reveal *Zea nicaraguensis* as a section *Luxuriantes* species close to *Zea luxurians*. *PLoS ONE*. 6: e16728.
- Weissinger, A.K., D.H. Timothy, C.S. Levings III, M.M. Gooman.** 1983. Patterns of mitochondrial DNA variation in indigenous maize races of Latin America. *Genetics*. 104: 365-379.
- Wellhausen, E.J., L.M. Roberts y E. Hernández X. con la colaboración de P.C. Mangelsdorf.** 1951. Razas de Maíz en México. Folleto Técnico No. 5. Oficina de Estudios Especiales. S.A.G. México, pp.237.
- Wilkes, H.G.** 1967. Teosinte: the closest relative of maize. Bussey Institution Harvard University, pp.159.
- Wilkes, H.G.** 1970. Teosinte introgression in the maize of the Nobogame Valley. *Bot Mus. Leafl. Harvard University*. 22: 297-311.
- Wilkes, H.G.** 1977. Hybridization of maize and teosinte, in Mexico and Guatemala and the improvement of maize. *Econ. Bot.* 31: 254-293.
- Wilkes, H.G.** 1979. Mexico and Central America as a Center for the origin of agriculture and the evolution of maize. *Crop Improv.* 6: 1-18.

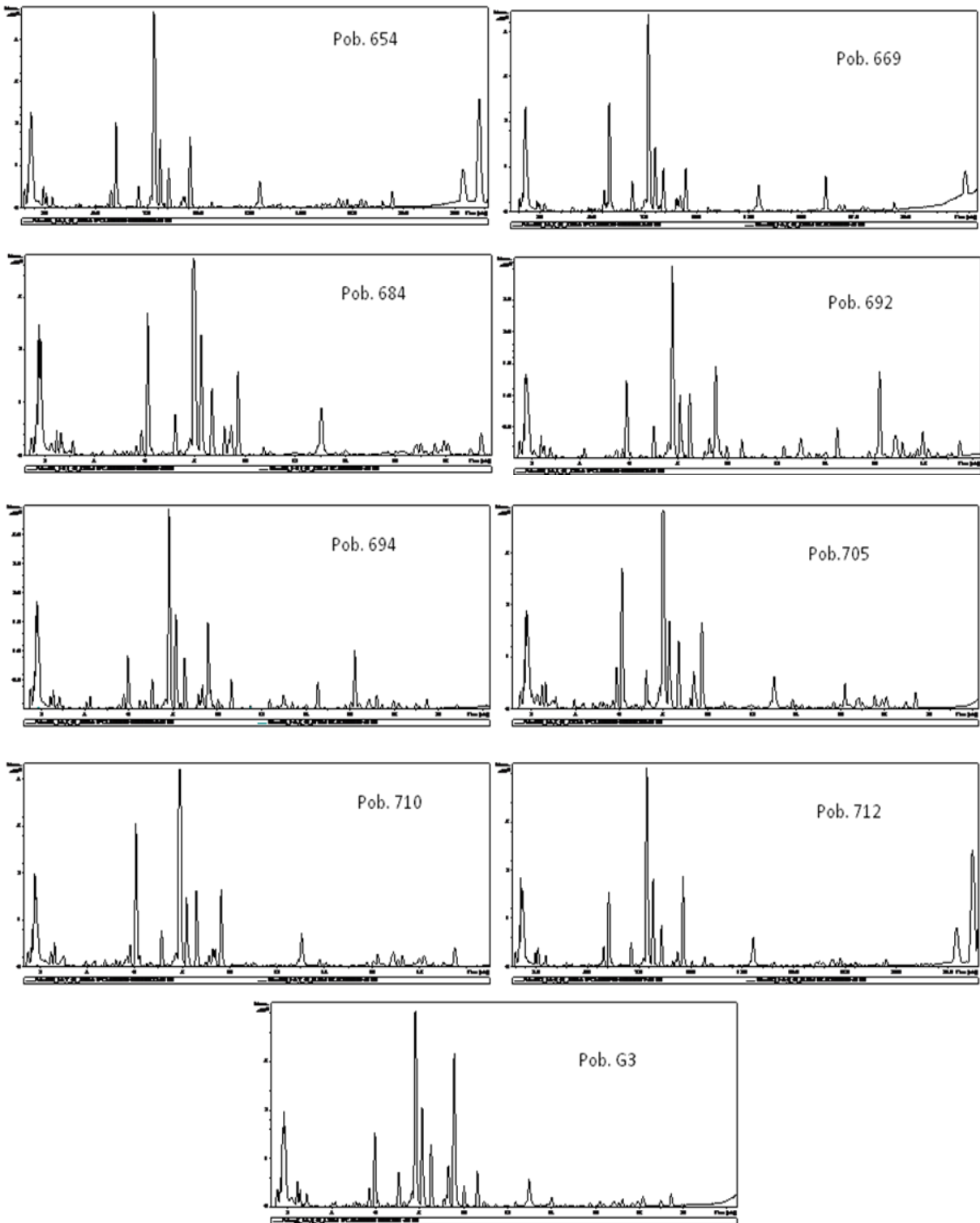
- Wilkes**, H.G. 2004. Corn strange and marvelous: But is a definitive origin know? En: Corn: Origin, History, Tenchnology, and Production (Ed. Smith, C.W.). John Wiley & Sons, pp.3-63.
- Wink**, M. y O. Schimmer. 1999. Modes of action of defensive secondary metabolites. En: Function of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology (Ed. Wink, M.). Sheffield Academic Press. England, pp: 17-134.
- Winkel-Shirley**, B. 2001. It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid netabolism. Plant Physiol. 127: 1399-1404.
- Yeh**, F.C., R.C. Yang, T. Boyle. 1999. Popgene Version 1.31. Microsoft Windows-based Freeware for populations genetic analysis. Quick User Guide, Alberta. http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html. Fecha de obtención 22 de mayo de 2012.
- Zein**, I., G. Wenzel, J.R. Andersen, T. Lübberstedt. 2007. Low level of linkage disequilibrium at the COMT (caffaic acid O-methyl transferase) locus in European maize (*Zea mays* L.). Genet. Resour. Crop Evol. 54: 139-148.
- Zimmer**, E.A., E.R. Jupe, V. Walbot. 1988. Ribosomal gene structure, variation and inheritance in maize and its ancestors. Genetics 120: 1125-1136.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Cromatogramas

Cromatogramas de polen





Cromatogramas de hoja

