

MARCADORES RAPD, HERRAMIENTA PARA LA DISCRIMINACIÓN ESPECÍFICA EN EL GÉNERO *Zea*

Norma Almaraz-Abarca¹, Diana María Rivera-Rodríguez¹, Jesús Sánchez-González², Amanda Delgado-Alvarado¹, Luis Gerardo Barriada-Bernal¹, Alfonso Reyes-Martínez¹, José Roberto Medina-Medrano¹, José Antonio Ávila-Reyes¹, José Natividad Uribe-Soto¹, Jesús Herrera-Corral¹, Néstor Naranjo-Jiménez¹

¹Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional,
Unidad Durango, Instituto Politécnico Nacional,
Sigma 119, Fraccionamiento 20 de Noviembre II, Durango, Dgo., 34200.
Tel/Fax: 618 8142091

²Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias,
Universidad de Guadalajara
Km 15.5 Carretera a Nogales, Zapopan, Jalisco, México.

RESUMEN

Treinta y seis poblaciones de *Zea mays* subespecie *mexicana*, *Zea mays* subespecie *parviglumis*, *Zea diploperennis*, *Zea perennis*, *Zea luxurians*, y *Zea nicaraguensis* fueron analizadas con un iniciador RAPD (OPA20) para determinar el potencial de discriminación específica de esos marcadores. El análisis de agrupamiento basado en los perfiles de amplificación por PCR (perfiles formados por 5 a 11 de entre un total de 25 loci amplificados para todas las muestras analizadas, con variación de tamaños entre 200 a alrededor de 2000 pb) sugiere que los marcadores RAPD están ampliamente distribuidos en el genoma de todos los taxa de *Zea* analizados y permitió distinguir perfiles con tendencia especie-específica. Los patrones del polimorfismo RAPD permitieron también, con cierta medida, la discriminación entre razas, y apreciar las siguientes tendencias: 1) el agrupamiento de las poblaciones de Guerrero de *Zea mays* subsp. *parviglumis* de la raza Balsas en un grupo separado del resto de las poblaciones de esa misma raza, 2) el agrupamiento de todas las poblaciones de *Zea mays* subsp. *mexicana* de la raza Chalco, 3) la separación de las poblaciones de *Zea mays* subsp. *mexicana* de la raza Mesa Central de Jalisco y Durango de las de la misma raza Mesa Central pero de latitudes al sur de esos estados, 4) la separación de *Zea luxurians* y *Zea nicaraguensis*, que aunque incluidas como parte de un grupo más grande, cada una formó un subgrupo independiente.

PALABRAS CLAVE: Teocintle, *Zea*, marcadores RAPD

ABSTRACT

Thirty six populations of *Zea mays* subespecie *mexicana*, *Zea mays* subespecie *parviglumis*, *Zea diploperennis*, *Zea perennis*, *Zea luxurians*, y *Zea nicaraguensis* were analyzed with the RAPD primer OPA20 to determine the potential of specific discrimination of those markers. The grouping analysis, based on the amplification profiles obtained by PCR (profiles formed by 5 to 11, from a total of 25 amplified loci, varying from 200 to around 2000 pb) suggests that RAPD are broadly distributed in the genome of all analyzed taxa of *Zea*, and allow distinguishing profiles with a species-specific tendency. The RAPD polymorphism profiles also partially allow discriminating among races, and appreciating the following tendencies: 1) the grouping of *Zea mays* subsp. *parviglumis* race Balsas from Guerrero a separate clade, 2) the grouping of all populations of *Zea mays* subsp. *mexicana* race Chalco, 3) the separation of *Zea mays* subsp. *mexicana* race Mesa Central of Jalisco and Durango, from other populations of the same race, 4) the separation of *Zea*

luxurians and *Zea nicaraguensis*, which, although forming part of the same group, each was placed in an independent subgroup.

KEY WORDS: Teocinte, *Zea*, RAPDS

INTRODUCCIÓN

El género *Zea* es nativo de México (Sanchez et al., 2000; Bedoya y Tovar, 2010). De acuerdo a Doebley (1990) y Sanchez et al. (2011), ese género está formado por siete taxa divididos en dos secciones, cuatro especies, y cuatro subespecies: Sección Luxuriantes: *Zea perennis* (Hitchc.) Reeves & Mangelsdorf, *Zea diploperennis* Iltis, Doebley & Guzmán, *Zea luxurians* (Durieu & Ascherson) Bird; Sección *Zea*: *Zea mays* subesp. *mexicana* (Schrader) Iltis, *Zea mays* subesp. *parviglumis* Iltis & Doebley, *Zea mays* subesp. *huehuetenanguensis* (Iltis & Doebley) Doebley, *Zea mays* subesp. *mays*. La única especie cultivada del género es *Zea mays* subesp. *mays*, que incluye a todas las variedades de maíz; el resto de las especies y subespecies son llamados colectivamente teocintle o teocintles, y son los parientes silvestres más cercanos al maíz.

Al teocintle se le ha atribuido una gran influencia en el origen y variabilidad de las principales razas de maíz en México (Wilkes, 2004); ha sido considerado como un recurso con potencial forrajero, debido a su calidad nutricional, potencial de rendimiento, y a sus mecanismos de dispersión y establecimiento (Sánchez-González et al., 1998); y se considera un germoplasma valioso para la creación de nuevas variedades de maíz, principalmente variedades resistentes a enfermedades y a factores ambientales adversos (Nault y Findley, 1981; Cohen y Galinat, 1984). *Zea mays* también ha sido explotado como forraje en países europeos (Zein et al., 2007; Andersen et al., 2007).

Dentro de la clasificación de los teocintles se reconocen tres razas para *Zea mays* subesp. *mexicana*: raza Chalco, raza Mesa Central, y raza Nobogame (Doebley, 1990); sin embargo nuevas poblaciones han sido descubiertas en diferentes regiones de México y Centroamérica (Iltis y Benz, 2000), las cuales requieren ser ubicadas taxonómicamente. Esto, y 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.

Entre los marcadores moleculares utilizados para detectar variabilidad genética en teocintle se encuentra el polimorfismo de nucleótidos individuales o SNP (van Heerwarden et al., 2010), diversidad de secuencias mitocondriales (Darracq et al., 2010), microsátélites (Matsuoka et al., 2002; Fukunga et al., 2005), diversidad de secuencias nucleares y cloroplásticas (Tiffin y Gaut, 2001; Moeller et al., 2007), y alineamiento de secuencias (Ross-Ibarra et al., 2009). De acuerdo a la revisión de literatura realizada para llevar a cabo el presente estudio, aparentemente no existen reportes previos sobre la variabilidad de teocintles revelada por marcadores moleculares RAPD, siendo algunas líneas de maíz, *Zea mays* subsp. *mays* los únicos elementos del género *Zea* analizados con esos marcadores (Pejic et al., 1998). En el presente trabajo se reportan los resultados preliminares de un estudio más amplio para determinar la capacidad de los marcadores RAPD para detectar variabilidad y discriminar entre especies y subespecies de teocintles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se analizaron de cuatro a cinco individuos de 36 poblaciones de las especies *Zea mays* subespecie *mexicana*, *Zea diploperennis*, *Zea perennis*, *Zea luxurians* y *Zea nicaraguensis*. Semillas de cada una de ellas

fueron proporcionadas por el Instituto de Manejo y Aprovechamiento de Recursos Fitogenéticos (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara, sembradas en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional unidad Durango del Instituto Politécnico Nacional (CIIDIR IPN Durango), en 2011. Datos geográficos de las muestras se presentan en la Tabla 1.

Extracción de ADN

Para la extracción del ADN se utilizó tejido foliar de plántulas de ocho semanas. El ADN se extrajo de manera individual, con el método reportado por Saghai-Marooft et al. (1984), basado en la utilización del detergente CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio).

Tabla 1. Datos geográficos de las muestras de *Zea* analizadas

Especie	Localidad	Lat (N)	Long (O)	Alt (m)	Referencia	Año de colecta de la semilla
<i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> Raza Balsas	San Lorenzo, Ejutla, Jal., México	19° 57' 6"	103° 59' 3"	1000	201	2007
<i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> Raza Balsas	El Rodeo, Tolimán, Jal., México	19° 33' 0"	104° 3' 0"	1462	232	2007
<i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> Raza Mesa Central	Cerro Churintzio, Churintzio, Mich., México	20° 9' 25"	102° 3' 35"	1949	426	2002
<i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> Raza Mesa Central	Uriangato, Uriangato, Gto., México	20° 10' 8"	101° 9' 22"	1880	447	2002
<i>Z. mays</i> subsp. <i>Mexicana</i> Raza Mesa Central	San Agustín del Maíz, Copándaro, Mich., México	19° 53' 27"	101° 10' 46"	1855	450	2002
<i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> Raza Balsas	Amatlán de Quetzalcoatl, Tepoztlán, Mor., México	18° 58' 30"	99° 1' 49"	1654	474	2003
<i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> Raza Balsas	San Cristobal, Honduras, Oaxaca, México	16° 19' 26"	97° 1' 57"	590	483	2003
<i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i>	Crucero Lagunitas, Tecoaapa,	16° 58' 56"	99° 16' 59"	590	487	2003

Raza Balsas	Guerrero, México					
<i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i>	Puerto de La Cruz, Carácuaro, Mich., México	18° 57' 47"	101° 3' 27"	870	517	2003
Raza Balsas						
<i>Z. mays</i> subsp. <i>Parviglumis</i>	Los Cimientos, Villa Purificación, Jal., México	19° 42' 15"	104° 49' 8"	552	546	2003
Raza Balsas						
<i>Z. diploperennis</i>	Las Joyas, Cuautitlán de García B., Jal., México	19° 35' 26"	104° 16' 41"	1870	551	2003
<i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i>	Arroyo Tarahumares, Guadalupe y Calvo, Chih., México	26° 12' 58"	106° 56' 33"	1928	607	2007
Raza Nobogame						
<i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i>	Chapultepec, México, México	19° 12' 12"	99° 34' 3"	2602	615	2007
Raza Chalco						
<i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i>	Km 1 Aljojuca-Santa María Coatepec, Aljojuca, Pue., México	19° 5' 51"	97° 33' 6"	2437	623	2007
Raza Chalco						
<i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i>	San Antonio Zoyatzingo, Amecameca, Estado de México	19° 4' 54"	98° 46' 35"	2468	635	2007
Raza Chalco						
<i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i>	Miraflores-La Candelaria Tlapa, Chalco, Estado de México	19° 13' 57"	98° 50' 3"	2280	638	2007
Raza Chalco						
<i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i>	Plan de los Timbres, Huitzuc de los Figueroa, Guerrero, México	18° 15' 9"	99° 14' 1"	1183	643	2007
Raza Balsas						
<i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i>	Vista Hermosa, Olinalá, Guerrero, México	17° 45' 37"	98° 46' 28"	1580	646	2007
Raza Balsas						
<i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i>	Camino Vista Hermosa-Colotlipa, Quechultenango, Guerrero, México	17° 26' 16"	99° 12' 5"	945	650	2007
Raza Balsas						
<i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i>	El Rincón, Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México	17° 17' 13"	99° 28' 59"	740	654	2007
Raza Balsas						

<i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> Raza Balsas	El Salado, Mochitlán, Guerrero, México	17° 23' 48''	99° 26' 12''	1150	657	2007
<i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> Raza Balsas	Zacatlancillo, Teloloapan, Guerrero, México	18° 25' 0''	99° 58' 3''	1746	661	2007
<i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> Raza Balsas	Ixcateopan, Guerrero, México	18° 30' 16''	99° 47' 4''	1891	666	2007
<i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> Raza Balsas	Oxtotitlán, Teloloapan, Guerrero, México	18° 38' 26''	100° 21' 24''	1098	669	2007
<i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> Raza Balsas	Huixtitla, Amatepec, Estado de México, México	18° 38' 26''	100° 21' 24''	1008	674	2007
<i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> Raza Balsas	Km 109 Tejupilco- Altamirano, Michoacán, México	18° 53' 41''	100° 12' 32''	1357	679	2007
<i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> Raza Balsas	Quechendio, Huetamo, Michoacán, México	18° 48' 18''	100° 56' 46''	631	684	2007
<i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> Raza Mesa Central	Cerro Grande, Ayotlán, Jalisco, México	20° 25' 21''	102° 20' 18''	1583	685	2007
<i>Zea</i> <i>diploperennis</i>	San Andrés Milpillas, Huajicori, Nayarit, México	22° 51' 26''	105° 6' 57''	1400	692	2008
<i>Zea perennis</i>	Piedra Ancha, San Gabriel, Jalisco, México	19° 38' 7''	103° 34' 47''	2140	694	2008
<i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> Raza Mesa Central	Potrero El Tepalcate, Nombre de Dios, Durango, México	24° 2' 32''	104° 16' 47''	1870	705	2009
<i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> Raza Mesa Central	Puente Gavilanes, Durango, Durango, México	24° 1' 12''	104° 29' 16''	1868	710	2009
<i>Zea perennis?</i>	El Fresno, Ziracuaretiro, Michoacán, México	19° 25' 0''	101° 56' 18''	1385	712	2010
<i>Z. mays</i> subsp. <i>huehuetenange</i> <i>nsis</i>	Monajil-Buxup, Santa Ana Huista, Huehuetenango,	15° 41' 32''	91° 49' 4''	1025	H1	2004

<i>Zea luxurians</i>	Guatemala Km 162 Agua Blanca-Ipala, Agua Blanca, Jutlapa, Guatemala	14° 31' 32''	89° 39' 45''	895	G3	2004
<i>Zea nicaraguensis</i>	Rancho Apacunca, Chinandega, Chinandega, Nicaragua	12° 52' 25''	86° 59' 0''	3	919	2007

Amplificación RAPD

La mezcla de amplificación se preparó de acuerdo a la Tabla 2. El iniciador RAPD usado fue el OPA20 (GTTGCGATCC). Las condiciones de amplificación fueron: un paso inicial de desnaturalización a 94° durante 3 min; seguido por 45 ciclos de 94° durante 1 min, 36° durante 2 min, y 72° durante 2 min; y finalmente un paso de extensión a 72° durante 10 min. Los loci amplificados se separaron en geles de agarosa al 2% y se tiñeron con Syber Green.

Tabla 2. Composición de la mezcla de amplificación

Compuesto	Concentración final
Iniciador	1.5 μ M
Regulador PCR	1X
MgCl ₂	1.75 mM
ADN	2 ng/ μ L
Taq Pol	0.1 U
dNTPs	0.2 mM
H ₂ O	La requerida para un volumen final de 25 μ L

Análisis de datos

Con los electroferogramas, conteniendo todos los loci amplificados, se elaboraron matrices binarias de presencia/ausencia de bandas vs. el número de individuos. Las matrices se sometieron a análisis de agrupamiento usando el programa Past 1.43. La similitud genética entre poblaciones (coeficiente de Jaccard), basada en los datos de los marcadores RAPD, se calculó y se presentó en un dendrograma construido con ese mismo programa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se amplificó un número total de loci de 25 para todas las muestras analizadas. Los tamaños de los loci variaron desde 200 a alrededor de 2000 pb. Ejemplos de los electroferogramas de RAPD obtenidos en el presente estudio se muestran en la Figura 1. Ese número de loci es cercano al obtenido (21) también con marcadores RAPD, para un primer, en *Cajanus cajan* (Choudhury et al., 2008); con marcadores ISTR para el genoma de siete especies de Agavaceae (32 loci por par de iniciadores, Torres-Morán et al., 2008), y también con marcadores ISTR para ocho especies de *Agave* (24 a 48 loci por par de iniciadores, Infante et al., 2006).

El número de loci amplificados por especie, raza y población fue variable. Los perfiles de amplificación RAPD variaron de 5 loci para *Zea mays* subsp. *mexicana* raza Nobogame, de Chihuahua (muestra 607), hasta 11 para *Zea luxurians* de Guatemala. Esos números de loci sugieren que los marcadores RAPD se encuentran bien distribuidos en el genoma de todos los taxa de *Zea* analizados.

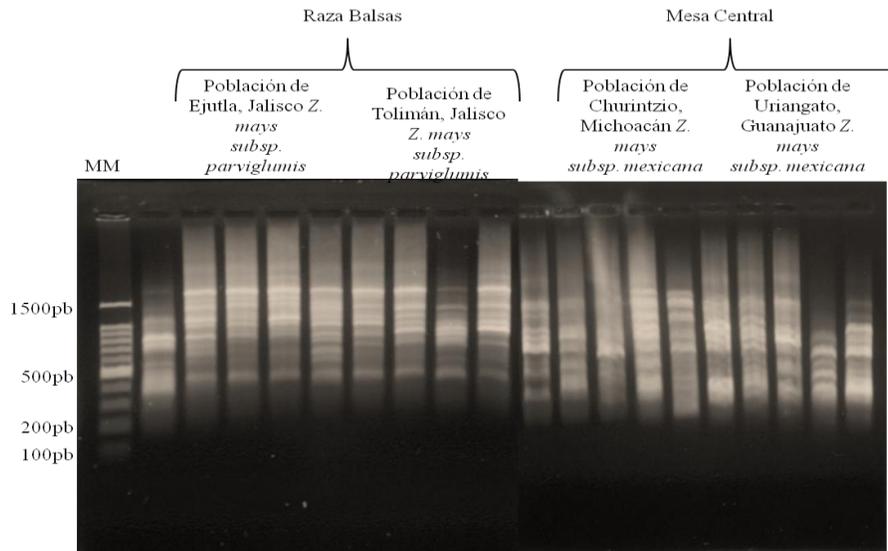


Figura 1. Perfiles de amplificación RAPD de 4 a 5 individuos de cuatro poblaciones de *Zea mays* subsp. *mexicana* y *Zea mays* subsp. *parviglumis*

El análisis de agrupamiento, representado por el dendrograma de la Figura 2, revela la variabilidad encontrada en los taxa analizados de *Zea*. Las poblaciones de *Zea mays* subsp. *mexicana* de la raza Mesa Central de Michoacán (426 y 450) y Guanajuato (447) forman un grupo relacionado a las poblaciones de *Zea mays* subsp. *parviglumis* de la raza Balsas de Morelos (474), Jalisco (201, 232, 546) Michoacán (517), Oaxaca (483), y una población de Guerrero (487). En la misma Figura 2 se observa un segundo grupo formado por las cuatro poblaciones de *Zea mays* subsp. *mexicana* de la raza Chalco, de Chapultepec, Estado de México (615); Puebla (623), Amecameca, Estado de México (635), y Chalco (638), junto con la población de *Zea diploperennis* de Jalisco (551), *Zea mays* subsp. *mexicana* de la raza Nobogame de Chihuahua (607), y la de *Zea diploperennis* de Nayarit. Una relación más cercana se detectó, con los marcadores RAPD, entre *Zea diploperennis* de Jalisco y la población de *Zea mays* subsp. *mexicana* de la raza Nobogame de Chihuahua, que entre las dos de *Zea diploperennis*.

Un tercer grupo, más grande que los anteriores, puede apreciarse en la Figura 2, formado por la mayoría de las poblaciones de *Zea mays* subsp. *parviglumis* de la raza Balsas de Guerrero (646, 650, 654, 666, 657, 643, 661, y 669); la de *Zea mays* subsp. *parviglumis* de la raza Balsas de Huetamo, Michoacán y de Tejupilco (679), y de Amatepec (674) del Estado de México. Ese tercer grupo tiene alguna relación con los teocintles perennes tetraploides *Zea perennis* de Jalisco (694) y la de Michoacán (712) y con la población de *Zea mays* subsp. *huehuetenangensis*, raza Huehuetenango (H1) de Guatemala. Un subgrupo lo componen las dos poblaciones de *Zea mays* subsp. *mexicana* de la raza Mesa Central de Durango (705 y 710) y una de esta misma raza de Jalisco (685). Finalmente, el último subgrupo lo componen *Zea luxurians* de Guatemala (G3) y *Zea nicaraguensis* de Nicaragua (919).

Los resultados del análisis de agrupamiento basado en los perfiles RAPD de todas las poblaciones de *Zea* analizadas permiten apreciar algunas tendencias: 1) la mayoría de las poblaciones de Guerrero de *Zea mays* subsp. *parviglumis* de la raza Balsas forman un grupo separado del resto de las poblaciones de esa misma raza, 2) todas las poblaciones de *Zea mays* subsp. *mexicana* de la raza Chalco forman parte del mismo grupo, 3) las poblaciones de *Zea mays* subsp. *mexicana* de la raza Mesa Central de latitudes más sureñas se separan de las de la misma raza de latitudes al norte (de Jalisco y Durango), 4) *Zea luxurians* y *Zea nicaraguensis*, aunque forman parte del grupo más grande, cada una forma un subgrupo independiente, 5) Los teocintles perennes se separan por nivel de ploidía, los diploides en el grupo donde está la población de *Z. mays* susp. *mexicana* raza Nobogame y los tetraploides en el grupo donde está la mayoría de las poblaciones de Guerrero de *Z. mays* subsp. *parviglumis*.

El dendrograma de la Figura 2 permite observar variabilidad entre algunas poblaciones de una misma raza y entre especies y subespecies, pero también, muestra que hay poblaciones genéticamente muy homogéneas, entre ellas *Zea mays* subsp. *parviglumis* de la raza Balsas de Jalisco (546), *Zea mays* subsp. *mexicana* raza Chalco de Puebla (623), raza Mesa Central de Durango (705), *Zea luxurians* de Guatemala (G3), y *Zea nicaraguensis* de Nicaragua (919). La misma Figura 2 permite apreciar también que las poblaciones 650 y 654 de la raza Balsas, ambas de Guerrero, son genéticamente similares con relación a los perfiles RAPD correspondientes al iniciador evaluado en el presente estudio, al igual que las poblaciones 615 y 623 de la raza Chalco del Estado de México y de Puebla, respectivamente; y las 635 y 638 de la raza Chalco de Amecameca y de Chalco, respectivamente.

Los resultados de este trabajo permiten apreciar a los marcadores RAPD como una herramienta para discriminar especies del género *Zea*, ya que las especies *Zea perennis*, *Zea diploperenis*, *Zea luxurians*, y *Zea nicaraguensis* presentan perfiles de amplificación típicos a cada una, sugiriendo que los marcadores RAPD pueden ser usados en estudios taxonómicos enfocados a la delimitación específica dentro de *Zea*, como lo han sido en otras especies de plantas (Weder, 2002; Choudhury et al., 2008).

CONCLUSIONES

Los marcadores RAPD evaluados están bien distribuidos en el genoma de todos los taxa de *Zea* analizados en el presente estudio, y es posible distinguir perfiles con tendencia especie-específica. Los patrones del polimorfismo RAPD permiten la discriminación entre especies, y en cierta medida entre razas, a partir de los loci amplificados compartidos y los loci únicos. Aunque se requiere realizar estudios poblacionales sobre la distribución de un número mayor de iniciadores RAPD entre los diferentes taxa del género *Zea*, los resultados de este trabajo sugieren que los perfiles de esos marcadores pueden ser de valor taxonómico específico e infraespecífico para ese género.

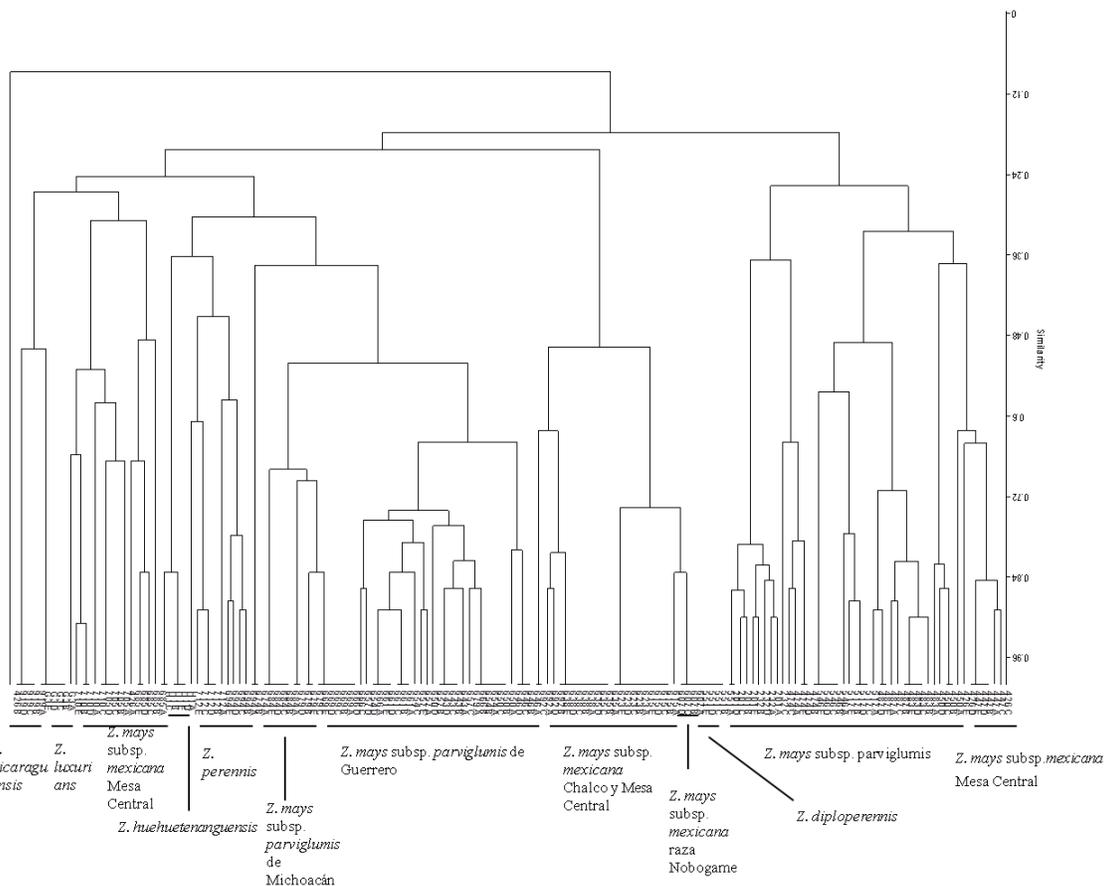


Figura 2. Dendrograma resultante del análisis de agrupamiento basado en marcadores RAPD de los taxa de *Zea* analizados

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 307-319.
- Bedoya, C. A., V. H. C. Tovar. 2010. Teocintle: el ancestro del maíz. *Claridades Agropecuarias* 201: 32-42.
- Choudhury, P. R., I. P. Singh, B. George, A. K. Verma, N. P. Singh. 2008. Assessment of genetic diversity of pigeonpea cultivars using RAPD analysis. *Biologia Plantarum* 52: 648-653.
- Cohen, J. I., W. C. Galinat. 1984. Potential use of alien germoplasm for maize improvement. *Crop Science* 24: 1011-1015.
- Darracq, A., J. S. Varré, P. Touzet. 2010. A scenario of mitochondrial genome evolution in maize base on rearrangement events. *BMC Genomics* 11: 233
- Doebly, J. F. 1990. Molecular systematic of *Zea* (Gramineae) *Maydica* 35: 143-150.
- 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.

- Ittis, H. H., Benz, B. F. 2000. *Zea nicaraguensis* (Poaceae), a new teosinte from Pacific Coastal Nicaragua. *NOVON* 10: 382-390.
- Infante, D., S. Molina, J. R. Demey, E. Gamez. 2006. Asexual genetic variability in Agavaceae determined with inverse-sequence-tagged repeats and amplification fragment length polymorphism analysis. *Plant Molecular Biology Reporter* 24: 205-221.
- Matsuoka, Y., Y. Vigouroux, M. M. Goodman, J. Sánchez, E. Buckler, J. Doebley. 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National academy of Sciences USA* 99: 6080-6084.
- Moeller, D., M. I. Tenaillon, P. Tiffin. 2007. Population structure and its effects on patterns of nucleotide polymorphism in teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*). *Genetics* 176: 1799-1809.
- Nault, L. R. W. R. Findley. 1981. *Zea diploperennis* a primitive relative offers new traits to improve corn. *Ohio Report on Research and Development in Agriculture. Home Economics and Natural Resources* 66: 90-92.
- Pejic, I., P. Ajmone-Marson, M. Morgante, V. Kozunplick, V. Castiglioni, P. Taramino, M. Motto. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by FRLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 1248-1255.
- Ross-Ibarra, J., M. Tenaillon, B. S. Gaut. 2009. Historical divergence and gene flow in the genus *Zea*. *Genetics* 181: 1399-1413.
- Saghai-Marouf, M. A., K. M. Soliman, R. A. Jorjensen, R. W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 8014-8018.
- Sánchez-González, J. J., Y. T. A. Kato, S. M. Aguilar, C. J. M. Hernández, R. A. López, C. J. A. Ruiz. 1998. *Distribución y Caracterización del Teocintle*. INIFAP. México.
- Sánchez, J. J., M. M. Goodman, C. W. Stuber. 2000. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Economic Botany* 54: 43-59.
- 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. *American Journal of Botany* 98: 1537-1548.
- Tiffin, P., 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.
- Torres-Morán, M. I., N. Almaraz-Abarca, A. P. Velasco-Ramírez, V. Hernández-Vargas, G. Orea-Lara, A. Cifuentes-Díaz de León, C. Oliver-Salvador. 2008. Taxonomic significance of ISTR to discriminate species in Agavaceae. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 3: 661-665.
- Van Heerwaarden, J., J. Ross-Ibarra, J. Doebley, J. C. Glaubitz, G. J. J. Sánchez, B. S. Gauts, L. E. Eguiarte. 2010. Fine scale genetic structure in the wild ancestor of maize (*Zea mays* ssp. *parviglumis*). *Molecular Ecology* 19: 1162-1173.
- Weder, J. K. 2002. Identification of plant food raw material by RAPD-PCR: Legumes. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50: 4456-4463.
- Wilkes, G. 2004. Corn, strange and marvelous: but is a definitive origin known? In: *Corn: Origin, History, Technology, and Production* (Ed. Smith, C. W.) John Wiley & Sons. New York, pp. 3-63.
- Zein, I., G. Wenzel, J. R. Andersen, T. Lübberstedt. 2007. Low level of linkage disequilibrium at the COMT (caffeic acid O-methyl transferase) locus in European maize (*Zea mays* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 139-148.