



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

**Genética de poblaciones de dos subespecies de maíz  
silvestre (*Zea mays ssp. mexicana* y *Zea mays ssp.  
parviglumis*)**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**BIOL. GABRIEL MERINO DÍAZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:  
DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:  
DR. DANIEL PIÑERO DALMAU  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM**

**DR. RAFAEL LIRA SAADE  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**MÉXICO, D. F. SEPTIEMBRE , 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

**Genética de poblaciones de dos subespecies de maíz  
silvestre (*Zea mays ssp. mexicana* y *Zea mays ssp.  
parviglumis*)**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIOL. GABRIEL MERINO DÍAZ**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

**DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

**DR. DANIEL PIÑERO DALMAU**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

**DR. RAFAEL LIRA SAADE**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

MÉXICO, D. F. SEPTIEMBRE , 2014

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática, en su sesión ordinaria del día 09 de diciembre de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del Posgrado en Ciencias Biológicas, del alumno **MERINO DIAZ GABRIEL** con número de cuenta **403017340** con la tesis titulada "**GENÉTICA DE POBLACIONES DE DOS SUBESPECIES DE MAÍZ SILVESTRE (*Zea mays ssp. mexicana* y *Zea mays ssp. parviglumis*)**", realizada bajo la dirección del **DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS**:

Presidente: DRA. SUSANA AURORA MAGALLON PUEBLA  
Vocal: DRA. FRANCISCA ACEVEDO GASMAN  
Secretario: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU  
Suplente: DR. JUAN PABLO JARAMILLO CORREA  
Suplente: DR. RAFAEL LIRA SAADE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 29 de agosto de 2014.



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

## **Agradecimientos Institucionales**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por darme la oportunidad de continuar mis estudios.

### **A los proyectos:**

Programa de Becas para Estudios del Posgrado del CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), por el apoyo económico brindado.

Proyecto CONACYT Investigación Científica Básica 2011.167826 (clave de identificación oficial CB2011/167826). Genómica de poblaciones: estudios en el maíz silvestre, el teocintle (*Zea mays* ssp. *parviglumis* y *Zea mays* ssp. *mexicana*).

Convenio, Acuerdo México–Francia relativo a la Formación y Capacitación para la Investigación Científica y Tecnológica, SEP-CONACYT-ANUIES-ECOS Francia, Clave del proyecto: M12-A03

Proyecto PAPIIT (Programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica), UNAM. Clave: IN202712 “Evolución molecular y conservación en helechos arborescentes (Cyatheaceae): filogenia, filogeografía y genética de poblaciones”.

### **A los miembros del comité tutor:**

:  
Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns (TUTOR PRINCIPAL)

Dr. Daniel Piñero Dalmau

Dr. Rafael Lira Saade

## **Agradecimientos personales**

A mi madre **Martha Díaz López**, por el apoyo incondicional y constante durante toda mi vida académica y personal.

A mí, por terminar una etapa más en el camino.

Al **Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns**, mi tutor, por dirigirme y darme la oportunidad de seguir mis estudios en el laboratorio, por haber conservado la paciencia en los momentos difíciles, por las lecciones dentro y fuera de clase, y por haber mantenido la confianza en mi trabajo.

A los miembros del Jurado:

**Dra. Susana Aurora Magallón Puebla**

**Dra. Francisca Acevedo Gasman**

**Dr. Daniel Piñero Dalmau**

**Dr. Rafael Lira Saade**

**Dr. Juan Pablo Jaramillo Correa**

Por las revisiones realizadas, las evaluaciones, las correcciones y los consejos atinados. Gracias por la objetividad y la disponibilidad para ayudarme a mejorar la tesis.

A **Ricardo Colin Nuñez** y **Santiago Ramírez Barahona**, por haberme capacitado (de forma práctica y teórica) en las diferentes técnicas de laboratorio que aprendí durante el desarrollo de esta investigación. Su experiencia en la implementación de ISSR fue determinante para la obtención de los resultados y también para el análisis posterior. Les agradezco su disponibilidad, su trabajo, sus consejos, su apoyo y su prestancia para conmigo, además de su amistad. A Santiago un agradecimiento especial por la enorme ayuda durante la etapa de análisis (con el bendito programa R) y la obtención de gráficas.

A Enrique Scheinvar, a Jonás y Jaime Gasca por el apoyo prestado para realizar algunos análisis. Gracias por su tiempo y por el interés mostrado. A Jaime Gasca un agradecimiento especial por el apoyo y la dirección en el campo.

A Laura y Erika, por darme las facilidades para trabajar en el laboratorio y por ofrecer un ambiente adecuado. Gracias también por sus consejos y por las llamadas de atención cuando se requirieron.

A todos los hijos del teocintle, por la camaradería mostrada en el campo, en el aula y en el laboratorio. A Alejandra Gutiérrez por sus consejos personales y académicos, por su sinceridad, amabilidad y por esa sonrisa automática que exhibe a cada momento. A Fely por su interés continuo en mi trabajo, por las largas pláticas rumbo a casa y por todas las invitaciones recibidas de su parte (a las que nunca pude asistir, pero que nunca faltaron). A Jonás por el apoyo siempre amable y eficiente en lo académico. A Beto por el compañerismo y por los buenos consejos. Gracias a todos por la ayuda recibida durante la siembra, el riego y el mantenimiento de las plantas, así como durante las colectas y las extracciones. Hablando de extracciones, gracias a la señora Silvia por

ayudarme sin miramientos durante las épocas de molienda y por mantener siempre en orden el laboratorio.

A todos los integrantes del Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, por soportarme, auxiliarme, aconsejarme y hasta convivir amigablemente conmigo. Jamás recibí indiferencia de alguien durante mi estancia en el laboratorio, lo cual agradezco enormemente. Gracias también a todos por la ayuda durante la desgranada de semillas que fue mucho trabajo para tesis ajenas a ustedes.

A **María de Los Ángeles Gutiérrez** por ser una de las piedras angulares de mi vida, por su amor, por su interés, por sus ilusiones para conmigo, por su confianza en mis capacidades, por darme tanto y tan bonito, por su respeto, por su calidad de persona y por su nobleza que siempre me estimula.

A **Maya Sathya** por ser alguien extremadamente relevante en mi vida, por ser mi amiga incondicional, mi consejera, por ser un soporte moral en momentos difíciles, por alegrarme el día, por ser un ejemplo para mí y sobretodo por el cariño tan sincero que siempre me demuestra.

A **Alberto Romo** por buscarme y mostrar un interés tal vez inmerecido, difícil encontrar un amigo mas fiel y más sincero. Eso siempre ayuda a mantenerse motivado.

A **Juan Manuel Sánchez**, mi amigo, por acompañarme durante mi maestría en el instituto y fuera de él. Gracias por la empatía y la admiración siempre mostradas, es totalmente recíproco. En una vida con muy pocos amigos eres de los mejores.

A todos mis amigos de antes y de ahora que de una manera u otra participan de mis logros y de mis fracasos, idas y venidas, decepciones y alegrías. Un agradecimiento muy especial a todos aquellos parientes y amigos que se me fueron (que son muchos) y que fueron determinantes en mi vida. Gracias a todos.



*A mi madre..*

*A todos los amigos que han muerto ....  
incluyendo a mi padre*

## Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Domesticación en <i>Zea mays</i> .....	3
Teocintles: Clasificación y distribución.....	4
Teocintles y maíz: una relación estrecha .....	5
Antecedentes.....	6
Marcadores moleculares: ISSRs.....	8
Objetivos.....	11
Planteamiento del problema y justificación.....	12
Material y métodos.....	13
Subespecies en estudio.....	13
Poblaciones utilizadas.....	14
Trabajo de laboratorio.....	15
Análisis de datos.....	17
Resultados.....	21
Diversidad genética por marcador.....	23
Frecuencias alélicas.....	24
Medidas de variación genética.....	24
Diversidad genética entre subespecies y razas de teocintle.....	27
Análisis Molecular de Varianza (AMOVA).....	27
Diversidad y altitud.....	28
Identificación de loci candidatos a patrones de selección.....	29
Estructura Genética en poblaciones de teocintle.....	30
Distancia genética.....	31
Aislamiento por distancia.....	33
Agrupamiento bayesiano de poblaciones.....	34
Análisis de componentes principales.....	35
Discusión.....	37
Niveles de variación y diferenciación genética en teocintle.....	38
Agrupación de las poblaciones de teocintle.....	42
Efecto de la altitud sobre los niveles de variación genética.....	44
Loci bajo procesos de selección y su relación con la altitud.....	46
Conclusiones.....	47
Literatura citada .....	48
Apéndices	
Apéndice I.....	59
Apéndice II.....	60
Apéndice III.....	61
Apéndice IV.....	62
Apéndice V.....	65
Apéndice VI.....	68
Apéndice VII.....	69
Apéndice VIII.....	70
Apéndice IX.....	71

## Resumen

El objetivo de esta tesis es evaluar los patrones de variación genética en poblaciones naturales de *Zea mays* ssp. *mexicana* y *Zea mays* ssp. *parviglumis* en términos de su diversidad genética, niveles de estructura poblacional y distancias genéticas. Se amplificaron 140 marcadores dominantes ISSRs en diez poblaciones distribuidas a través de un gradiente altitudinal y geográfico, con un promedio de 28 individuos por población. Obtuvimos un alto porcentaje de loci polimórficos (97.79%) y una alta heterocigosis esperada (0.3050). La diversidad genética no se distribuyó de manera uniforme, con las poblaciones del norte de Michoacán presentando la mayor diversidad ( $H_e=0.2852$ ), mientras aquellas con la menor diversidad fueron las del municipio de Villa Purificación en Jalisco ( $H_e=0.20335$ ). Aunado a esto nosotros encontramos una correlación significativa entre la altitud sobre el nivel del mar y la heterocigosis ( $r=0.638$ ,  $P=0.047$ ), y entre la altitud y el porcentaje de loci polimórficos ( $r=0.681$ ,  $P=0.030$ ). Sin embargo, esta asociación no es significativa dentro de cada subespecie. Usando un método bayesiano y uno no-bayesiano obtuvimos un coeficiente de coancestría de  $\theta =0.2194$  y  $\theta =0.1837$ , respectivamente. Se determinó que la región de Jalisco presentó la mayor estructura entre sus poblaciones (0.2859). Utilizando un AMOVA se encontró que el 3.13% de la variación total se encuentra entre subespecies, 19.3% entre poblaciones dentro de las subespecies y 77.57% dentro de las poblaciones. Resultados similares se obtuvieron para el agrupamiento por raza. La prueba de Mantel resultó significativa, indicando que existe un patrón de aislamiento por distancia en las poblaciones ( $r=0.57$ ,  $P =0.0007$ ). Finalmente se obtuvo consistente evidencia de agrupamiento por regiones (meseta central, centro y sur de Guerrero, y suroeste de Jalisco) mediante el programa Structure v2.3.4 y el método UPGMA. Aunado a esto, se presentan poblaciones que fluctúan (dependiendo del método utilizado) en cuanto a su pertenencia a los grupos formados (aquellas del estado de México, Morelos y norte de Guerrero), debido probablemente a que se encuentran en una zona de solapamiento entre regiones distintas. Dados los altos valores de estructura, se recomienda la protección *in situ* y/o *ex situ* de las poblaciones, sobre todo las del municipio de Villa Purificación, (Jalisco). Aunque estas poblaciones presentan menor diversidad genética, pueden mantener alelos raros y únicos dada su alta diferenciación con respecto a las otras poblaciones.

## Abstract

The objective of this study is to evaluate the patterns of genetic variation in natural populations of *Zea mays* ssp. *mexicana* and *Zea mays* ssp. *parviglumis* in terms of their genetic diversity, levels of population structure and genetic distances. We amplified 140 ISSRs dominant markers in ten populations distributed across a geographical and altitudinal gradient, with an average of 28 individuals per population. We found a high percentage of polymorphic loci (97.79%) and a high expected heterozygosity ( $H_e=0.3050$ ). The genetic diversity was not uniformly distributed, with Northern Michoacan populations presenting higher diversity ( $H_e= 0.2852$ ) than the Jalisco populations ( $H_e= 0.20335$ ). In addition we found a significant correlation between the altitude above the sea level and the heterozygosity ( $r=0.638$ ,  $P=0.047$ ), and between the altitude and the percentage of polymorphic loci ( $r= 0.681$ ,  $P= 0.030$ ). However this association was not significant within each subspecies. Using a Bayesian and a non-Bayesian approach, we obtained the coancestry coefficient  $\theta=0.2194$  and  $\theta=0.1837$ , respectively. We found that the region of Jalisco has the highest structure between populations. Using an AMOVA we found that 3.13 % of the total variation is distributed between subspecies, 19.3 % among populations within subspecies and 77.57 % within populations. Similar results were obtained while clustering by race. The Mantel test was significant, indicating a pattern of isolation by distance among populations ( $r= 0.57$ ,  $P = 0.0007$ ). Finally we obtained consistent geographical clusters (central plateau, central and southern Guerrero and southwestern Jalisco) using the program Structure v2.3.4 and an UPGMA method. Added to this, there are some populations that fluctuate (depending on the method used) in terms of its membership in the groups formed (those of the state of Mexico, Morelos and northern Guerrero), probably because they are in a overlap zone that occurs between distinct regions. Given the high levels of structure, it is highly recommended the protection (*in situ* or *ex situ*) of populations in the municipality of Villa Purificación in Jalisco. Although these populations have the lowest genetic diversity, they may also have rare and private alleles given their high differentiation from other populations.

## **Introducción**

### **Domesticación en *Zea mays***

El papel que han desempeñado las diferentes especies cultivadas en la historia de la humanidad es fundamental, ya que estas fueron determinantes durante el proceso de formación de civilizaciones sedentarias tempranas que obtenían alimento gracias a la agricultura (Serratos-Hernández, 2009). El proceso que comenzó desde la elección de las especies silvestres y continuó con la selección por parte del hombre de determinadas variedades, derivó en el desarrollo de un proceso evolutivo llamado *domesticación*. Este se define como la selección genética (en este caso producto de la manipulación para el cultivo) continua ejercida por los humanos durante la adaptación de las plantas (Gepts, 2004) y que genera cambios a nivel fenotípico y genotípico.

Entre las plantas que se han sido domesticadas se encuentran varias gramíneas (familia Poaceae), de las cuales existen registros desde hace por lo menos 10,000 años en distintas partes del planeta (Pernés, 1983; Piperno *et al.*, 2009). Desde aquellos tiempos, y a través de técnicas de agricultura, se ejerció (y se sigue ejerciendo) una fuerte selección artificial sobre diversos caracteres morfológicos y fisiológicos como la cantidad y el tiempo de maduración de los granos, la rigidez de su envoltura, el tamaño de la espiga y la capacidad de dispersión (Pernés, 1983; Benz, 2001). Este proceso resultó con el paso del tiempo en plantas con caracteres más adecuados a las necesidades alimenticias del hombre. Tan es así que las gramíneas domesticadas como el arroz, la cebada, la caña de azúcar, el maíz y el trigo representan el 50% de las calorías consumidas por el hombre en la actualidad (Ross-Ibarra, *et al.*, 2007).

En particular, el maíz ha significado a lo largo de la historia un recurso de extrema importancia como alimento, material industrial, materia prima y combustible (Sánchez, 2011). Esta planta fue fundamental en el desarrollo de numerosas civilizaciones en América (donde fue domesticado), siendo parte integral de su cultura (Serratos-Hernández, 2009). El proceso de domesticación y selección posterior ha derivado en un gran número de variedades que son cultivadas en zonas y climas variados (diferente altitud, latitud, precipitación, temperatura) (Serratos-Hernández, 2009; Sánchez, 2011). Tal potencial adaptativo es consecuencia de una alta diversidad genética, atípica con respecto a otras plantas domesticadas, dados los efectos reductores de la variación genética del proceso de domesticación (Buckler y Stevens, 2006).

Los estudios dedicados al maíz y a su proceso de domesticación son relativamente numerosos, aunque pocos han sido liderados por mexicanos (Doebley *et al.*, 1990; Doebley 1990; Doebley *et al.*, 1995; Matsuoka *et al.*, 2002; Matsuoka, 2005; Raneré *et al.*, 2008; Hastorf, 2009). De la información obtenida en esos estudios, se destaca al teocintle como posible origen del maíz cultivado.

### **Teocintles: clasificación y distribución**

Los teocintles son plantas anuales y perennes (estas últimas diploides o tetraploides) nativas de México y América Central (Doebley y Iltis, 1980; Doebley, 1990). Son parecidas morfológicamente al maíz, pero exhiben ramificaciones a partir del tallo principal, tienen inflorescencias masculinas (espigas) menos ramificadas y un gran número de inflorescencias femeninas en los nodos de la planta. Además, tienen una mazorca más pequeña y un número mucho menor de granos que el maíz, los cuales presentan forma triangular y una cubierta más dura (Sánchez *et al.*, 1998; Mondragón-Pichardo y Vibrans, 2005) (Fig. 1).



**Fig. 1.** Características distintivas de la planta de teocintle (*ssp. mexicana*). a) granos en forma triangular b) individuo maduro con tallos ramificados, c/u con numerosas mazorcas (Fotos. Heike Vibrans. a) Sur del estado de Guanajuato, b) Tlaxcala. Tomadas de Jehuite.blogspot.mx y www.cuexcomate.com)

En términos taxonómicos, los teocintles pertenecen al género *Zea* (Poaceae). Dentro del género, el maíz doméstico (*Zea mays ssp. mays*) es el taxón más conocido por su gran importancia. Sin embargo, algunas especies o subespecies de teocintle han sido de utilidad como forraje para el ganado (Iltis *et al.*, 1979; Mondragón-Pichardo y Vibrans, 2005) y para usos tan diversos como la elaboración de remedios caseros (Mondragón-Pichardo y Vibrans, 2005). Su mayor importancia, sin embargo, radica en

el hecho de que son el grupo ancestral del maíz y potencialmente una fuente de diversidad para éste.

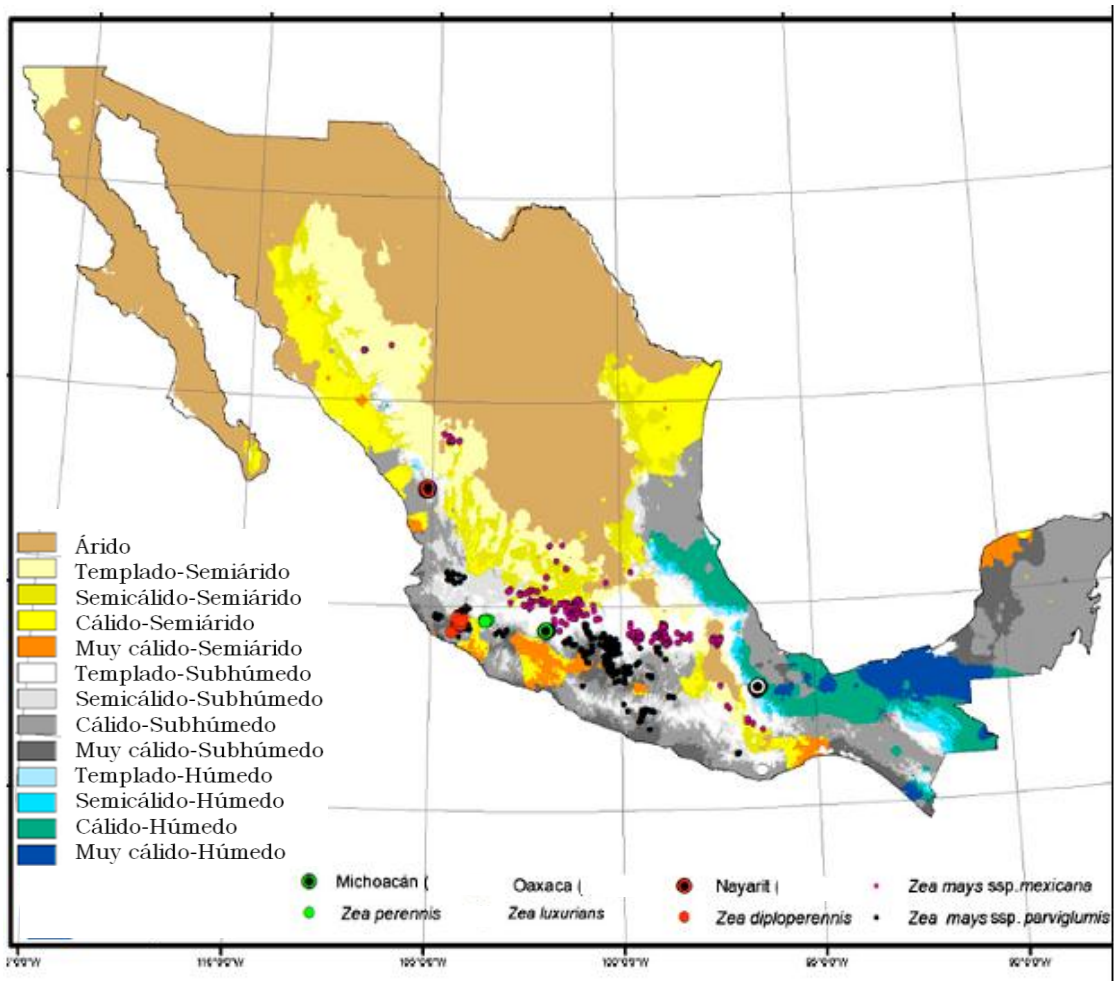
El género *Zea* está subdividido en dos grandes secciones: la sección *Zea* con una sola especie, y la sección *Luxuriantes* con tres taxa (Doebley 1990). Dentro de la sección *Zea* la única especie, *Zea mays*, está a su vez subdividida en cuatro subespecies: *Zea mays* ssp. *mexicana*, *Zea mays* ssp. *parviglumis*, *Zea mays* ssp. *huehuetenangensis* y *Zea mays* ssp. *mays* (el maíz doméstico). *Z. mays* ssp. *mexicana* se distribuye en el altiplano mexicano, mientras *Z. mays* ssp. *parviglumis* se encuentra en las tierras bajas tropicales (Sánchez y Ruiz-Corral, 1996) (Figura 2). Por su parte, *Zea mays* ssp. *huehuetenangensis* lo hace en Guatemala, Honduras y Nicaragua (Sánchez y Ruiz-Corral, 1996; Sánchez *et al.*, 1998).

### **Teocintles y Maíz: una relación estrecha**

Las subespecies *Zea mays* ssp. *parviglumis* y *Zea mays* ssp. *mexicana* son particularmente interesantes por el rol que han jugado en el proceso de domesticación del maíz. Así, la ssp. *parviglumis* ha sido propuesta como el ancestro del cual se originó el maíz doméstico en el área de la cuenca del río Balsas (Doebley *et al.*, 1984; Doebley 1990; Matsuoka *et al.*, 2002; Raneré *et al.*, 2008; Hastorf, 2009). Por otro lado, *Zea mays* ssp. *mexicana* crece como maleza en los campos de cultivo de maíz doméstico (Doebley *et al.*, 1987) en donde se han encontrado híbridos y retrocruzas a diferente nivel (Baltazar *et al.*, 2005; Fukunaga *et al.*, 2005; Ross-Ibarra *et al.*, 2009; Van Heerwaarden *et al.*, 2011). Por esta razón se ha sugerido que esta subespecie ha jugado un papel primordial en la adaptación local del maíz doméstico, particularmente en alturas elevadas (Baltazar *et al.*, 2005; Ellstrand, *et al.*, 2007).

La historia de ancestría y flujo génico entre el teocintle y el maíz doméstico, magnifica la importancia de estudios para estos grupos, sobre todo a la luz de investigaciones que señalan el peligro en que se encuentran algunas de las poblaciones de teocintle (Wilkes, 1997; Sánchez *et al.*, 1998; Wilkes, 2007; Godínez-Herrera *et al.*, 2009). Entre otras causas, ambas subespecies se ven amenazadas por cambios en el uso del suelo, apertura de caminos, cambio de cultivos, urbanización, y abandono de campos de cultivo de maíz, lo que las ha llevado a un estado de vulnerabilidad o incertidumbre. La desaparición de estas poblaciones –y a largo plazo, de las subespecies- o la pérdida de variación genética en ellas, supondría además la pérdida de una herramienta esencial en torno a los programas de mejoramiento para el maíz (Casas

et al., 2003) debido a la pérdida de recurso genéticos en forma de genes útiles ante necesidades agronómicas particulares.



**Fig. 2.** Distribución de especies y subespecies de teocintles (tomado y modificado de Sánchez *et al.*, 2011).

## Antecedentes

Desde los primeros trabajos publicados a principios de 1900 (Lumholtz, 1902, en Sánchez *et al.*, 1998), donde se hace conciencia de la existencia de estas plantas, hasta la actualidad, se han realizado no menos de cincuenta estudios acerca de este grupo de plantas en los que se estudian diversos aspectos de su biología. Varios de ellos se han dedicado a la identificación de nuevas especies, subespecies y razas (Iltis *et al.*, 1979; Iltis y Benz, 2000; Sánchez *et al.*, 2011) y a tratar de establecer una clasificación coherente y actualizada (Timothy *et al.*, 1979; Doebley y Iltis, 1980; Iltis y Doebley, 1980; Fukunaga *et al.*, 2005; Sánchez, 2011). Otros trabajos incluyen análisis comparativos de tipo morfológico (Smith *et al.*, 1981; Sánchez *et al.*, 1998), citológico



(Kato-Yamakake, 1975) y bioquímico (Stephen *et al.*, 1980). Sin embargo, el mayor porcentaje de estudios en teocintles está destinado a entender sus relaciones pasadas y presentes con el maíz, la mayoría enfocándose en la domesticación (Doebley, 1990; Doebley *et al.*, 1995; Matsuoka, 2005), particularmente a partir de *Zea mays* ssp. *parviglumis* (Doebley 1984 y 1990; Matsuoka *et al.*, 2002; Raneré *et al.*, 2008; Hastorf, 2009).

Además de las investigaciones ya mencionadas, se ha recurrido a la búsqueda y producción de híbridos entre especies, subespecies y variedades del género *Zea* que, al manifestarse, pueden indicar la existencia de flujo génico entre ellas. Sobre todo se ha hecho énfasis en los híbridos, y su respectiva fertilidad (Collins y Longley, 1935; Rogers, 1950a, 1950b y 1950c; Doebley *et al.*, 1990; Harshberger, 1999; Ellstrand, *et al.*, 2007). En este sentido, Baltazar *et al.* (2005) y Kermicle (1990) aportan evidencia, no sólo de la capacidad de hibridación entre el maíz y el teocintle, sino de la dirección más probable de introgresión en poblaciones naturales (y cultivadas) que es del teocintle hacia el maíz.

También se han utilizado otras formas de estimar flujo génico entre estos grupos, que no implican la observación de híbridos y que más bien identifican patrones de estructuración genética entre poblaciones. La idea de que existe flujo génico entre *Zea mays* ssp. *parviglumis* y el maíz doméstico causa controversia, dado que algunos autores proponen es o ha sido reducido (Doebley *et al.*, 1987; Van Heerwaarden *et al.*, 2011; Warburton *et al.*, 2011), mientras que otros sugieren que el flujo es o ha sido considerablemente alto (Ellstrand, 2007). Por otro lado, en *Zea mays* ssp. *mexicana*, no existe tal controversia. Estudios con isoenzimas (Doebley *et al.*, 1987), ADN de cloroplasto (Doebley, 1990), microsatelites (Matsuoka *et al.*, 2002; Fukunaga *et al.*, 2005), secuencias nucleares (Ross-Ibarra *et al.*, 2009) y SNPs (Van Heerwaarden *et al.*, 2011) han determinado flujo génico entre el maíz y esta subespecie a diferentes niveles. También es importante señalar que se ha reportado flujo génico recurrente entre las dos subespecies de teocintle (Doebley, 1990; Ross-Ibarra *et al.*, 2009).

En cuanto al flujo génico entre poblaciones de una misma subespecie también se han generado avances. Por ejemplo, Van Heerwaarden *et al.* (2010) aportaron evidencia de alto flujo génico y poca estructura genética entre poblaciones de *Zea mays* ssp. *parviglumis*, mientras que Moeller *et al.* (2007) encontraron una estructura genética considerable entre poblaciones de esta subespecie en la región de Jalisco, utilizando ADN de cloroplasto.

Una mención especial merecen los estudios dedicados a evaluar la variación en teocintles y particularmente en las dos subespecies de interés para el presente trabajo. Doebley (1984), a través del estudio de isoenzimas en accesiones\* de maíz y teocintle, encontró una alta variabilidad dentro y entre poblaciones de la subespecie *Zea mays* ssp. *parviglumis*, y aún más alta entre poblaciones de la ssp. *mexicana*. Por su parte, Rincón-Enríquez *et al.* (2005) y Sánchez (2011), también con isoenzimas, encontraron alta variación en accesiones de las dos subespecies, aunque la ssp. *mexicana* presentó los valores más altos. Por otro lado, Fukunaga *et al.* (2005) aportaron evidencia de alta diversidad genética en microsatélites para todas las especies y subespecies de teocintle (todas accesiones). Igualmente, Terra *et al.* (2011) y Almeida *et al.* (2011) determinaron una alta diversidad genética dentro las poblaciones y un alto porcentaje de loci polimórficos para una sola población de *Zea mays* ssp. *mexicana*.

### **Marcadores moleculares: ISSRs (Inter-simple sequence repeats)**

A partir de los primeros estudios que tuvieron como objetivo caracterizar y describir la variación genética entre y dentro de las poblaciones utilizando isoenzimas (Hubby y Lewontin 1966; Lewontin y Hubby, 1966), se intensificó la búsqueda de marcadores cada vez más eficientes, que proporcionaran mayor información en términos de variación y que fueran de fácil manejo y bajo costo. Como resultado, se desarrollaron diversos marcadores moleculares como los RAPDs (Amplificación al azar de ADN polimórfico), los RFLPs (polimorfismo en longitud de fragmentos de restricción), los AFLPs (polimorfismo en longitud de fragmentos amplificados) y los SSRs (secuencias simples repetidas o microsatélites) (Vos *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1997; Bardakci, 2001; Varshney *et al.*, 2005). A pesar de su utilidad, algunas desventajas propias de cada método han limitado su uso y su confiabilidad.

Los ISSRs (secuencias repetidas intersimples) fueron utilizados por primera vez por Zietkiewicz *et al.* (1994) y Gupta *et al.* (1994). Estos, además de generar una vasta información en cuanto al número de polimorfismos, habían permitido cubrir las principales limitantes de los marcadores ya mencionados, es decir, la baja reproducibilidad de los RAPDs, el alto costo de los RFLPs y AFLPs, y la necesidad de información previa de las secuencias amplificadas, indispensable para implementar el

---

\* Una accesión es, en este contexto, la unidad básica de manejo en una colección *ex situ* de recursos fitogenéticos con aplicación en conservación y mejoramiento genético (Hamilton *et al.*, 2002), que incluye, en este caso, semillas de algunos de los individuos de una población en una localización determinada

uso de microsatélites (Pradeep *et al.*, 2002). Otras ventajas de los ISSRs incluyen: a) posibilidad de realizar análisis multilocus (gran cantidad de bandas por individuo dependiendo del iniciador y de la especie); b) fácil manejo; c) alta sensibilidad a nivel específico, inter e intrapoblacional; y d) existen en la actualidad un número elevado de *primers* o iniciadores universales para plantas (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Godwin *et al.*, 1997; Pradeep *et al.*, 2002).

En términos metodológicos, los ISSRs son marcadores dominantes (en los cuales no se puede diferenciar entre homócigos dominantes y heterócigos) que amplifican regiones entre microsatélites (SSRs), de tal manera que la gran cantidad de estos últimos en el genoma de las plantas (Sonah *et al.*, 2011) es aprovechada por el método para generar un sinnúmero de marcadores. De hecho, los iniciadores de ISSRs son precisamente microsatélites idénticos (motivos repetitivos de di-, tri-, tetra- o pentanucleótidos) orientados en dirección opuesta, que flanquean la región amplificada y pueden o no estar anclados (con 1 a 4 bases degeneradas además de la secuencia del microsatélite) (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Bornet y Branchard, 2001). La metodología asociada a estos marcadores es relativamente sencilla, de modo que mediante la amplificación de las secuencias por el método de PCR, el polimorfismo generado es observado realizando una electroforesis en gel de agarosa con la correspondiente tinción con bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta. Este tipo de marcador es sensible a la presencia o ausencia de las secuencias amplificadas y a la longitud de estas (Zietkiewicz *et al.*, 1994), de tal manera que los datos pueden registrarse a través de una matriz de presencias y ausencias para su posterior análisis. Los ISSRs se han utilizado en numerosas investigaciones, como los análisis filogenéticos (Gupta *et al.*, 1994), la diferenciación entre variedades (Tiarovska *et al.*, 2013), la identificación de procesos de hibridación (Wolfe *et al.*, 1998a; Wolfe *et al.*, 1998b), el mapeo genómico (Kojima *et al.*, 1998), la identificación de genes potencialmente sujetos a selección natural (Pradeep *et al.*, 2002), la genética de la conservación (Culley y Wolfe, 2001) y el análisis de procesos cancerosos (Basik *et al.*, 1997). Los objetos de estudio de estos trabajos son variados e incluyen; animales (Kostia *et al.*, 2000; Machkour-M'Rabet, *et al.*, 2009; Stolpovskii *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2012), hongos (Zhou *et al.*, 1999; Sawyer *et al.*, 2003), algas (Vis, 1999), fitoplancton (Bornet *et al.*, 2004) y plantas, incluyendo especies cultivadas como el arroz (Blair *et al.*, 1999; Virk *et al.* 2000; Girma *et al.*, 2010), la cebada (Sánchez de la Hoz *et al.*, 1996; Hou *et al.*, 2005; Guasmi, *et al.*, 2012), el trigo (Nagaoka y Ogihara, 1997; Kojima *et al.*, 1998; Cavan *et al.*, 2000), el

sorgo (Oliveira *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996) y el maíz (Kantety *et al.*, 1995; Wolfe *et al.*, 1998a; Wolfe *et al.*, 1998b; Amaral-Junior *et al.*, 2011; Tiarovska *et al.*, 2013).

A pesar de las grandes ventajas expresadas anteriormente, el uso de ISSRs se ha visto limitado por otras razones que tienen que ver con la naturaleza dominante de estos marcadores y la imposibilidad de detectar homoplasias (Sánchez de la Hoz *et al.*, 1996; González y Aguirre, 2007 en Eguiarte *et al.*, 2007). En el caso de las homoplasias, diferentes loci pueden amplificar productos con el mismo peso molecular que dificulte distinguirlos entre sí (Lynch y Milligan, 1994), lo cual puede resultar en un sesgo metodológico importante al registrar polimorfismos. Por otro lado, La naturaleza dominante impone límites claros en el número y tipo de análisis que pueden realizarse con los datos obtenidos, sobre todo por la imposibilidad de obtener parámetros de diversidad observados (necesarios en numerosos análisis), y por suponer condiciones de equilibrio en las poblaciones. Sin embargo, cabe destacar que en el actual estudio así como en otros anteriores, el uso de factores de corrección como el desarrollado por Lynch y Milligan (1994) y nuevos algoritmos y parámetros derivados del uso de métodos bayesianos (que no asumen condiciones en equilibrio) (Pritchard *et al.*, 2000; Holsinger y Lewis, 2007) han aportado mayor confianza a los análisis y han permitido incorporar los ISSRs en aplicaciones similares a las de los marcadores codominantes.

## Objetivos

### Objetivo general

- Evaluar los niveles y patrones de variación genética en poblaciones de dos subespecies de teocintle (*Zea mays* ssp. *mexicana* y *Zea mays* ssp. *parviglumis*) y sus presuntas razas mediante el uso de marcadores dominantes (ISSRs), y analizar los posibles factores que afectan la distribución de la variación genética en estos taxa.

### Objetivos particulares

- Calcular la diversidad genética en poblaciones y grupos de poblaciones en términos de sus frecuencias alélicas esperadas
- Obtener los valores de estructura genética entre poblaciones y grupos de poblaciones (subespecies y razas) por medio de estadísticos equivalentes a  $F_{ST}$  y distancias genéticas entre las poblaciones.
- Establecer cómo se encuentra distribuida la variación genética entre y dentro de los supuestos grupos de teocintle.
- Comprobar mediante diferentes métodos de agrupación las relaciones de similitud entre las poblaciones.
- Demostrar si existe o no un patrón de aislamiento por distancia a través del total de poblaciones y de cada subespecie.
- Determinar si existe correlación entre los parámetros de variación genética y los valores de altitud y latitud asociados a las poblaciones.

## Planteamiento del problema y justificación

Los teocintles son considerados variedades silvestres de gran importancia por considerarse reservas genéticas útiles dentro del contexto del mejoramiento de cultivos. La colecta exhaustiva de muestras de teocintle (en forma de accesiones) se destina principalmente a planes de conservación de la riqueza alélica por medio de colecciones de germoplasma. Sin embargo, son pocos los estudios dedicados a evaluar el estado genético actual de las poblaciones naturales en términos de la diversidad y estructura genética. Estos parámetros y sus patrones resultantes pueden arrojar información sobre el efecto de las diferentes fuerzas evolutivas que actúan sobre las poblaciones, influyendo claramente sobre la disponibilidad de los recursos genéticos. Aunado a esto, se ha demostrado el peligro en que se encuentran muchas de sus poblaciones debido a diferentes actividades antrópicas. Por esto es de vital importancia el estudio inmediato de los procesos que ocurren en las poblaciones de teocintle, lo que en el mejor de los casos puede enriquecer futuros planes de conservación para estas variedades de extrema importancia. Una manera efectiva de lograr lo anterior es por medio de la genética de poblaciones, la cual pretende primero determinar la cantidad de variación genética existente en las poblaciones naturales y después explicarla en términos de su importancia evolutiva, origen y mantenimiento (Hartl y Clark, 1997).

Cabe destacar que el trabajo descrito en esta tesis no tiene precedentes en el sentido de que no se han encontrado estudios en teocintles que utilicen ISSRs como marcadores moleculares en poblaciones naturales. Por otra parte, en contraste con muchos estudios anteriores dentro del mismo género, se hizo énfasis en el muestreo de poblaciones naturales y no de accesiones, porque si bien las accesiones pueden representar efectivamente parte de la riqueza alélica de una población (útil para efectos de conservación y mejoramiento genético) (Hamilton *et al.*, 2002), su uso no permite realizar análisis intrapoblacionales más detallados, por ejemplo en la búsqueda de patrones de variación y estructura genética que necesitan la estimación de frecuencias alélicas (Hedrick, 2005). En este sentido las accesiones de teocintle disponibles (en las diferentes colecciones), representan además poblaciones de diferentes años (muchas de ellas), por lo que no pueden ser representativas de la condición genética actual del conjunto de poblaciones.

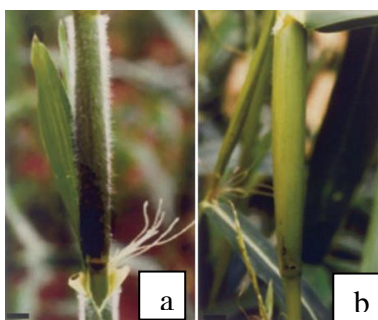
## Material y métodos: Subespecies en estudio

*Zea mays* ssp. *mexicana* [Descripción taxonómica basada en los estudios de Iltis y Dobley *et al.* (1980), Sánchez *et al.* (1998) y Lauter *et al.* (2004)].

Plantas de gran crecimiento con espiga de gran tamaño (39 a 45 cm), robusta y rígida, generalmente con poca ramificación (17 a 30 ramas). Sus espiguillas miden de 7.6 a 10.5 mm de longitud y de 2.3 a 3.8 mm de ancho, desarrollando de 9 a 12 semillas por mazorca. Las semillas son duras y grandes (6 a 10 mm de longitud y 4 a 6 mm de ancho) con un ápice afilado del lado axial. En la madurez presentan frecuentemente abundantes microvellosidades (tricomos) y vainas con pigmentación oscura (por antocianinas) (Fig. 3a). Se distribuye casi siempre en las cuencas y pendientes del altiplano, usualmente por arriba de los 2,000 msnm y creciendo asociada al maíz cultivado. Su distribución incluye los estados de Michoacán, Guanajuato, Querétaro, Edo. de México, Chihuahua, Durango, Distrito Federal, Puebla y la parte noreste del estado de Jalisco (Sánchez y Ruiz-Corral, 1996). La subespecie incluye a su vez a las razas Chalco y Meseta Central (Wilkes, 1967).

*Zea mays* ssp. *parviglumis* [Descripción taxonómica basada en los estudios de Iltis y Dobley *et al.* (1980), Sánchez *et al.* (1998), y Lauter *et al.* (2004)].

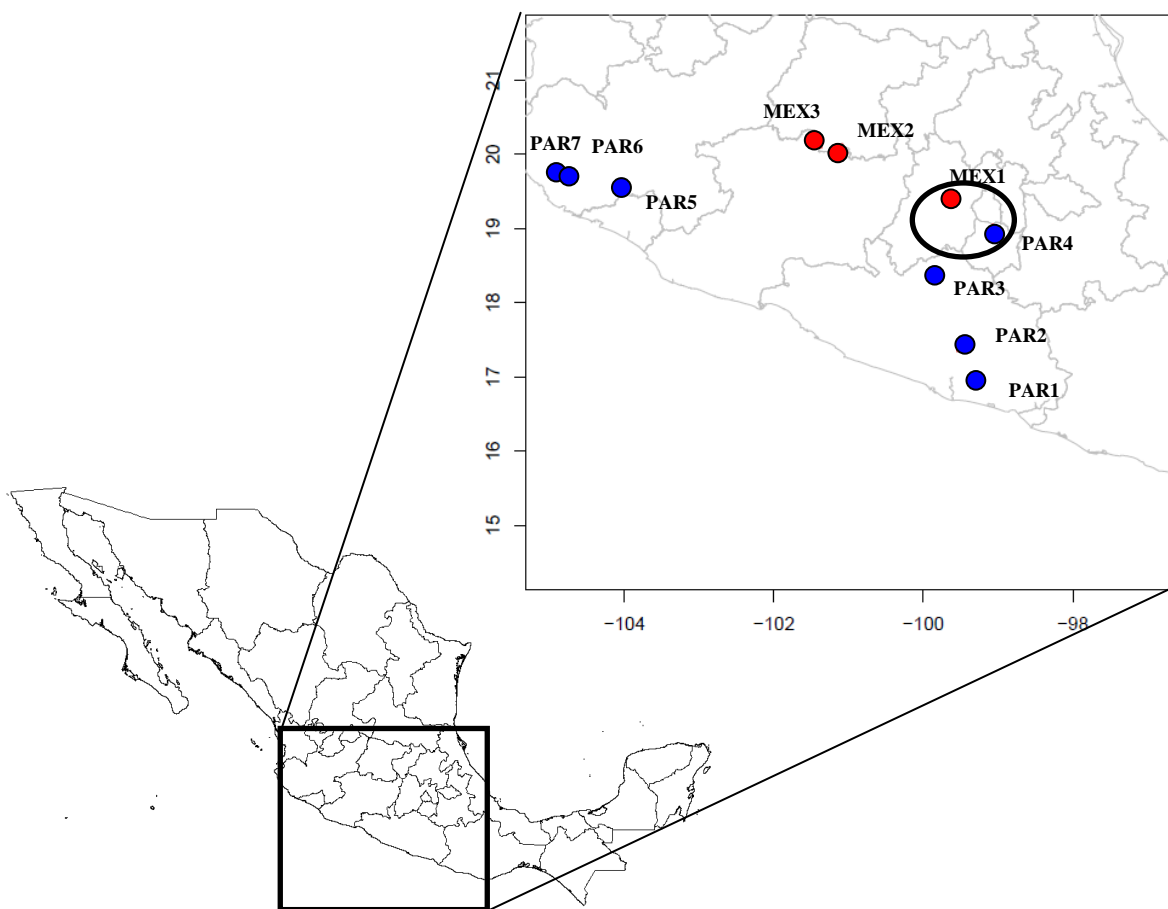
Su inflorescencia masculina es delicada, pequeña y frecuentemente muy ramificada (de 45 hasta 200 ramas), incluso presentando ramificación terciaria. Las espiguillas miden de 4.6 a 7.2 mm de longitud y de 1.6 a 2.6 mm de ancho. Desarrollan de 5 a 9 semillas por mazorca. Estas semillas son duras, relativamente pequeñas (5 a 8 mm de longitud y 3 a 5 mm de ancho) y regularmente sin filo en el lado axial. La planta, en general, no presenta microvellosidades (tricomos) o vainas pigmentadas (Fig.3b). Se distribuye en tierras bajas tropicales, particularmente en la cuenca del Río Balsas y en elevaciones de hasta 1,400 msnm. Su distribución incluye los estados de Guerrero, Colima, Morelos, Edo. de México, Michoacán, Jalisco y el sur de Nayarit (Sánchez y Ruíz-Corral, 1996).



**Fig. 3.** Tricomos y pigmentación en teocintles: a)ssp. *mexicana* y b)ssp. *parviglumis* (tomado de Lauter *et al.*, 2004)

### Poblaciones utilizadas

Se utilizaron muestras colectadas en los años 2009 y 2010 en un total de diez poblaciones (Fig. 4), para las cuales se registraron las coordenadas geográficas y la altitud. Se colectaron cerca de 35 semillas de alrededor de 30 individuos adultos por población. Para *Zea mays* ssp. *mexicana*, la colecta incluyó poblaciones en Michoacán y el Estado de México en altitudes entre 1849 a 2581 msnm. Para *Zea mays* ssp. *parviglumis*, los muestreos se realizaron en Morelos, Guerrero y Jalisco, en altitudes que iban de los 504 hasta los 1649 msnm (Tabla 1).



**Fig. 4.** Localización geográfica de las diez poblaciones muestreadas pertenecientes a las subespecies de teocintle *Zea mays* ssp. *mexicana* (círculos rojos) y *Zea mays* ssp. *parviglumis* (círculos azules). Ver Tabla 1 para la clave de referencia de cada población. El círculo negro indica una supuesta zona de hibridación en los límites de la distribución de las dos subespecies. Las poblaciones ubicadas dentro este círculo fueron eliminadas en algunos análisis (ver texto en pág. 18) para probar el efecto de esta zona sobre los patrones de distribución de la variación genética



**Tabla 1.** Localización, abreviación y coordenadas geográficas de las siete poblaciones de *Zea mays ssp. parviglumis* y tres localidades de *Zea mays ssp. mexicana* analizadas en este estudio.

Nombre	Ubicación	Raza	Coordenadas geográficas		Altitud (msnm)
			Latitud N	Longitud O	
PAR1	Teconoapan, Gue.	Balsas	16°58'52.1"	99°17'7.7"	581
PAR2	Chilpancingo, Gue.	Balsas	17°23'30.3"	99°28'39.5"	1201
PAR3	Teloloapan, Gue.	Balsas	18°20'59.4"	99°50'27.9"	1649
PAR4	Huilotepec, Mor.	Balsas	18°58'26.8"	99°4'13"	1664
PAR5	Tolimán, Jal.	Jalisco	19°32'7.3"	104°3'29.7"	1369
PAR6	Villa de purificación, Jal.	Jalisco	19°43'56.9"	104°52'18.7"	572
PAR7	Telpitita, Jal.	jalisco	19°42'55.6"	104°48'17.6"	504
MEX3	Villa Seca, Edo. de Méx.	Chalco	19°24'26.9"	99°37'37.4"	2581
MEX4	Santa Ana Maya, Mich.	Meseta central	20°3'11.5"	101°5'17.2"	1849
MEX5	Puruándiro, Mich.	Meseta central	20°08'01.7"	101°26'03.0"	2002

\*PAR= indica las poblaciones pertenecientes a *Z. mays ssp. parviglumis*.

\*MEX= indica las poblaciones pertenecientes a *Z. mays ssp. mexicana*

## Trabajo de laboratorio

### Siembra y mantenimiento

Las semillas colectadas se almacenaron en sobres de papel bien cerrados y en cajas selladas para evitar el desarrollo de hongos. Posteriormente, las semillas de 30 individuos por cada población fueron sembradas en macetas medianas (de aproximadamente 25 cm de diámetro) con tierra negra y tierra de hojarasca, y se estableció un régimen de riego diario. Cuando las plantas alcanzaron una altura mínima de 20 cm, se procedió a cortar una hoja para realizar la extracción de ADN.

### Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo el protocolo de CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio) de Doyle y Doyle (1987) inicialmente modificado por Vázquez-Lobo (1996) (Apéndice I), al cual se le hicieron nuevos cambios buscando mayor

eficiencia en el proceso de extracción (Apéndice II). Las modificaciones relevantes incluyeron el rescate de mayor cantidad de sobrenadante (con ADN) y el aumento en tiempo y velocidad del proceso de centrifugación en los últimos pasos de la metodología.

### **Selección de marcadores**

Se evaluaron diez iniciadores de la serie 9 desarrollados por la Unidad de Servicios de Proteínas-Ácidos Nucleicos (NAPS) de la Universidad de Columbia Británica (Vancouver, Canadá) en función del número de bandas observado, del número de polimorfismos y de la calidad de los patrones de bandeo derivados de la amplificación. Para esta evaluación se utilizaron cinco individuos de cada una de las 10 poblaciones, incluyendo así ambas subespecies. Se seleccionaron cinco marcadores para establecer sus condiciones de amplificación óptimas, en términos de buena cantidad de productos amplificados y un patrón de bandas claro y reproducible al realizar la electroforesis. Las secuencias repetidas para cada uno de los iniciadores seleccionados fueron las siguientes:

**809 (AG)<sub>8</sub>G : AGA GAG AGA GAG AGAGG**

**810 (GA)<sub>8</sub>T : GAG AGA GAG AGA GAG AT**

**811 (GA)<sub>8</sub>C : GAG AGA GAG AGA GAG AC**

**827 (AC)<sub>8</sub>G : ACA CAC ACA CAC ACA CG**

**841 (GA)<sub>8</sub>YC : GAG AGA GAG AGA GAG AYC\***

**\*Y = A ó C**

### **Amplificación de ADN**

Una vez estandarizados los marcadores, se realizó la amplificación para el total de individuos muestreados mediante termocicladores PCR-express modelo Veriti 96 de la marca Applied Biosystems y utilizando la enzima *Taq*-polimerasa proveniente de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las condiciones de amplificación para cada marcador al realizar el PCR se encuentran disponibles en el Apéndice III. Los productos de PCR resultantes se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% utilizando TAE 0.5X como buffer y bromuro de etidio como agente intercalante. Cada gel se fotografió con una cámara digital modelo Kodak EDAS 240 y cada banda polimórfica fue genotipificada para elaborar matrices de ausencia y presencia. Para esta parte fueron excluidos aquellos loci ubicados en los extremos de los geles, es decir aquellas bandas con tamaños muy grandes o muy

pequeños (en pares de bases). En este estudio el rango de tamaño (en pares de bases) tomado como referencia para excluir este tipo de bandas fue variable dependiendo del *primer* (ver Fig. 5-9). Las razones para excluir las bandas tienen que ver, ya sea por problemas de homoplasia en las bandas más pequeñas o de reproducibilidad para las más grandes (Gonzalez-Fortes, 2008).

## **Análisis de datos**

### **Frecuencias alélicas.**

Se estimaron las frecuencias alélicas para todos los loci considerando primero todas las poblaciones y después cada población por separado. Debido a la naturaleza dominante del marcador, no es posible hacer estimados directos de frecuencias alélicas, de tal modo que estas fueron obtenidas con base en la frecuencia de alelos recesivos mediante el programa TFPGA versión 1.3 (Miller, 1997) asumiendo un sistema de dos alelos por locus y equilibrio de Hardy-Weinberg. Para reducir el sesgo impuesto por estos supuestos se aplicó la corrección de Lynch y Milligan (1994). Con el mismo software se realizó también una prueba exacta de Raymond y Rousset, (1995) para determinar si existen diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de: a) todas las poblaciones de teocintle; b) entre subespecies y c) entre poblaciones de cada subespecie. La prueba se realizó con 1000 corridas iniciales de cadena larga (*dememorization steps*), 10 corridas de cadena corta (*batches*) y 2000 permutaciones por corrida.

### **Variación genética.**

Con el programa TFPGA v.1.3 (Miller, 1997) se estimaron, para el total de poblaciones y para cada población, subespecie, raza y marcador genético, parámetros descriptivos básicos incluyendo: a) la heterocigosis esperada ( $H_e$ ), que fue estimada aplicando la corrección de Lynch y Milligan (1994), y b) el porcentaje de loci polimórficos ( $P$ ), que fue determinado bajo el criterio del 95% de confianza. La heterocigosis esperada ( $H_e$ ) también fue estimada mediante el programa Hickory v1.1 (Holsinger y Lewis, 2003-2007), que utiliza un método bayesiano que no supone que las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg (HW). Como una medida alternativa de diversidad también se estimó el índice de diversidad de Shannon ( $I$ ) mediante el

programa POPGENE V1.31 (Ye *et al*, 1997) para cada loci, población, raza y subespecie de teocintle.

Una vez obtenido el valor de heterocigosis y del índice de Shannon, se realizó una prueba de igualdad de medias entre poblaciones, razas y subespecies de teocintle. Cuando se compararon los valores promedio entre las diez poblaciones, se aplicó la prueba de Welch debido a que las varianzas no fueron homogéneas (aún transformando los datos). Se utilizó la prueba C de Dunnette como prueba *Post-hoc*. Las otras dos pruebas, entre razas y entre subespecies se realizaron mediante un ANOVA y una prueba de *t*, respectivamente.

### **Análisis Molecular de Varianza (AMOVA)**

Para determinar a qué niveles está distribuida la variación genética se aplicaron varias pruebas AMOVA mediante el software ARLEQUIN v.3.1 (Excoffier, 1998-2007). Para ello se agruparon inicialmente las poblaciones por subespecie, considerándose dos grupos, uno conformado por las poblaciones de *Z. mays* ssp. *parviglumis* y otro con las de *Z. mays* ssp. *mexicana*. Para la segunda prueba, el agrupamiento de las poblaciones se realizó con base en la raza (Jalisco, Chalco, Balsas y Meseta Central) a la que pertenecía cada una de ellas basados en los resultados obtenidos con microsatélites por Fukunaga *et al.* (2005). Por último, se realizaron dos pruebas más tomando como grupos las razas dentro de cada subespecie, es decir, se realizó una prueba AMOVA para cada subespecie.

### **Variación genética y altitud**

Con base en las coordenadas geográficas presentadas en la Tabla 1 y por medio del programa IBM SPSS Statistics 19 (IBM Corp., 2010) se realizó un análisis de correlación de Pearson para estudiar las relaciones de los parámetros de diversidad (en las subespecies y en el total de poblaciones) con la latitud y longitud de cada población. Dado que se conoce que el gradiente de altitud (y el clima relacionado con ésta) es un factor que puede influir en los niveles de diversidad genética, se llevó a cabo un análisis de regresión lineal simple entre estas variables para el conjunto total de poblaciones y para las dos subespecies por separado..

Por otra parte, se realizó un análisis para identificar loci candidatos a estar bajo procesos de selección. Éste se realizó mediante un método bayesiano a través del programa BayeScan (Foll y Gaggiotti, 2008) que, a través de diferencias en las

frecuencias alélicas entre poblaciones para cada locus, identifica aquellos que no se ajustan a patrones esperados bajo un modelo neutral. El criterio de decisión se basó en un umbral de q-value\* del 10%, de tal manera que el 10 por ciento de los candidatos (*outliers*) se consideraron falsos positivos. Después, mediante el programa IBM SPSS Statistics 19, se aplicaron pruebas de correlación de Pearson para los loci retenidos considerando las frecuencias alélicas (presencias) y la altitud de cada población.

### **Estructura genética**

Para determinar el grado de estructura entre y dentro de las poblaciones, se estimó el estadístico  $\theta$  (Weir y Cockerham, 1984) que es un equivalente de  $F_{ST}$  (índice de fijación subpoblacional) (Wright, 1951), que estima el porcentaje de la varianza genética que se encuentra entre la población total y las subpoblaciones. Tal índice, junto con sus intervalos de confianza, se estimaron a través del programa TFPGA utilizando 10,000 réplicas (*bootstrap*) con un intervalo de confianza del 95%. Este parámetro se estimó también por medio de una aproximación bayesiana con el programa Hickory v1.1 (Holsinger y Lewis, 2003-2007) utilizando la función *free model*, que estima el valor de  $\theta$  a través de una distribución *a priori* del parámetro  $F_{is}$  (coeficiente de endogamia). En los dos métodos el cálculo se realizó; a) para el total de poblaciones; b) para cada subespecie; c) para cada raza; d) entre subespecies, y e) entre razas.

Aunado a esto, y debido a que se incluyeron en el análisis poblaciones ubicadas en una zona de solapamiento de las distribuciones de las subespecies (lo cual podía conducir a una subestimación de la diferenciación entre éstas), se calculó el mismo parámetro, pero sin considerar estas poblaciones. En este caso el parámetro  $\theta$  se estimó: a) entre subespecies y b) entre razas.

### **Distancias genéticas**

La distancia genética original de Nei (1972) fue obtenida mediante el software TFPGA v.1.3 (Miller, 1997). Esta medida fue calculada para cada par de poblaciones y con el conjunto de ellas se realizaron matrices pareadas para el total de poblaciones y para cada subespecie por separado. Estas matrices se utilizaron para elaborar un dendrograma mediante el método UPGMA con el objetivo ilustrar las relaciones entre

---

\*El q-value de un locus es la tasa mínima de falsos positivos en la cual un locus puede ser significativo en términos de estar potencialmente sujeto a selección (Foll y Gaggiotti, 2008).

las poblaciones. El soporte estadístico de las ramas del dendrograma se determinó con 10,000 permutaciones *bootstrap* con un 95% de confianza.

### **Aislamiento por distancia**

Se efectuó una prueba de Mantel (1967) a través del paquete Ecodist (Goslee y Urban, 2007) del programa R (R Core Team, 2012), con el que también se obtuvieron las distancias geográficas necesarias para el análisis (Magnusson, 2012). Esta prueba se realizó para el total de poblaciones y para cada subespecie por separado. Para determinar la significancia, se utilizaron 10,000 permutaciones con un 95% de confianza.

### **Agrupamiento bayesiano de poblaciones**

Mediante el programa Structure v.2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) se obtuvieron los valores de probabilidad posterior para cada agrupamiento propuesto ( $k$ ) de las poblaciones de ambas subespecies (donde el número de grupos es la variable a determinar). Se consideraron desde 1 hasta 10 grupos para el cálculo, con 10 repeticiones por corrida. En cada una de ellas se descartaron las primeras 10,000 iteraciones como *burn-in* y estas fueron seguidas de otras 100,000 iteraciones. A través del método de Evanno *et al.* (2005) se determinó el número más probable de poblaciones ( $k$ ). Posteriormente se calculó la probabilidad posterior de pertenencia de cada individuo a cada uno de los grupos utilizando un modelo de entrecruzas y suponiendo que las frecuencias alélicas están correlacionadas entre sí.

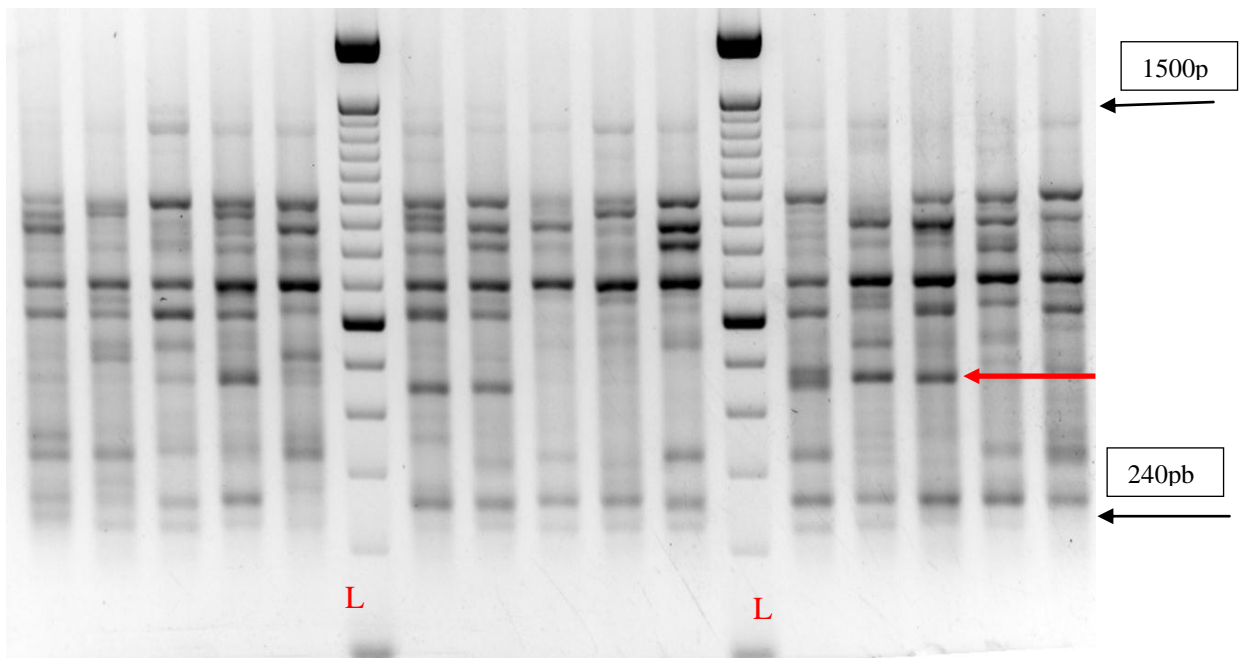
### **Análisis de componentes principales (ACP)**

El ACP fue realizado por medio del programa R (R Core Team, 2012) utilizando como variables las frecuencias alélicas de cada uno de los loci genotipados. Se escogieron los componentes que explican un mayor porcentaje de la varianza y se graficaron para ilustrar la formación de grupos de poblaciones.

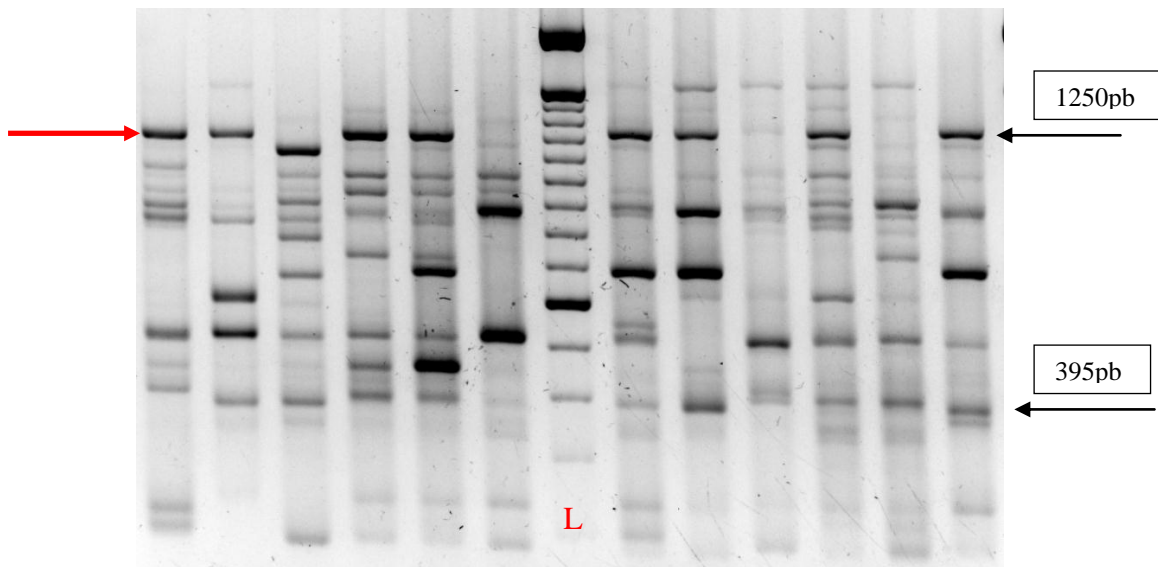
## Resultados

De las diez combinaciones de *primers* evaluadas, únicamente cinco fueron utilizadas para realizar el estudio. Estas presentaron en su conjunto un total de 137 loci polimórficos (con el criterio del 95%), incluyendo las dos subespecies (*Z. mays* ssp. *parviglumis* y *Z. mays* ssp. *mexicana*). La contribución en bandas (loci) polimórficas de cada iniciador en total fue: 24 para el iniciador **841**, 29 para el iniciador **811**, 25 para el **810**, 37 para el **809** y 22 para el **827**.

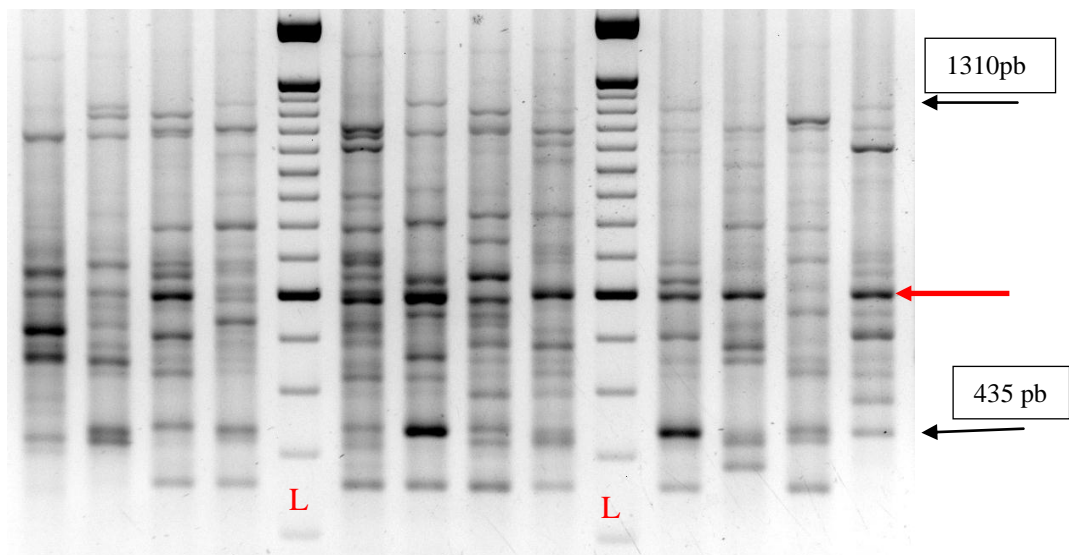
Las diferencias más evidentes, al realizar un análisis rápido de los patrones de bandeo, se presentaron entre las poblaciones de Jalisco (Telpitita y Villa purificación), del norte de Michoacán y del sur de Guerrero. Estas se encuentran separadas geográficamente de forma considerable. Un ejemplo del patrón de bandeo para cada marcador se ilustra en las figuras 5 a 9. El marcador de peso molecular (L) en las figuras es de 100 pares de bases.



**Fig. 5.** Amplificación por medio de ISSR para individuos de la población Telpitita (PAR7) (ssp. *parviglumis*). Iniciador 809. En cada carril se visualiza un individuo de la población, con múltiples bandas amplificadas. En el centro dos marcadores de peso molecular (L). Los loci considerados van de 240 hasta 1500 pares de bases (flechas negras). La flecha roja señala un ejemplo de polimorfismo dentro de la población.

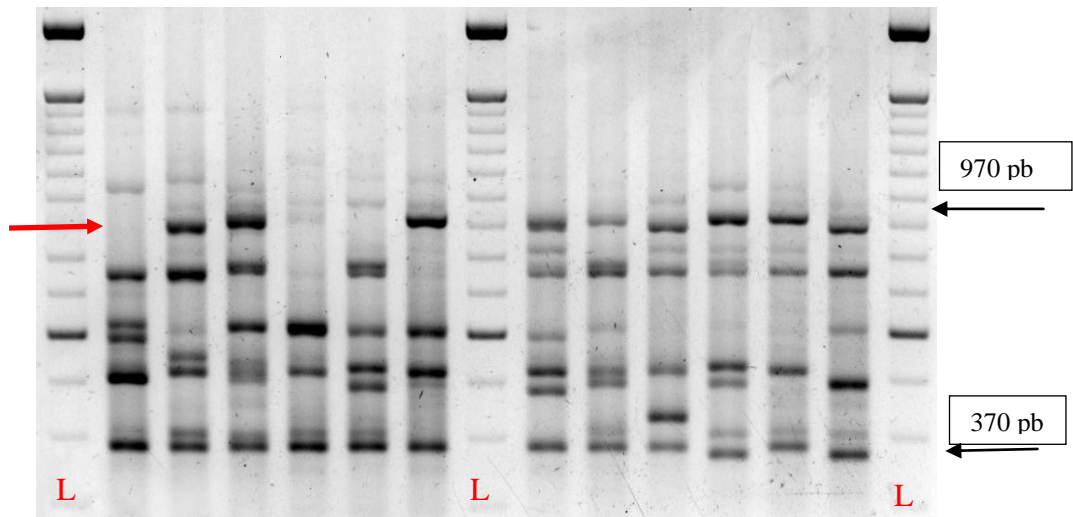


**Fig. 6.** Amplificación por medio de ISSR para individuos de la población Huilotepec (PAR4) (*ssp. parviglumis*). Iniciador 810. En cada carril se visualiza un individuo de la población con múltiples bandas amplificadas. En el centro un marcador de peso molecular (L). Los loci considerados van de 395 hasta 1250 pares de bases (flechas negras). La flecha roja señala un ejemplo de polimorfismo dentro de la población.

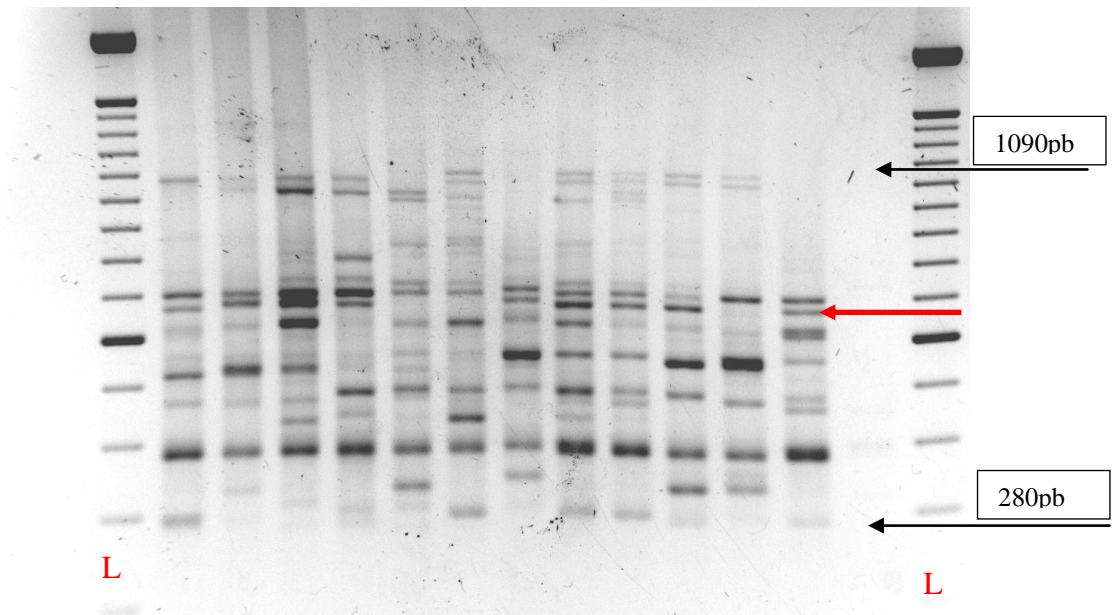


**Fig. 7.** Amplificación por medio de ISSR para individuos de la población Villa Seca (MEX1) (*ssp. mexicana*). Iniciador 811. En cada carril se visualiza un individuo de la población con múltiples bandas amplificadas. En el centro dos marcadores de peso molecular (L). Los loci considerados van de 435 hasta 1310 pares de bases (flechas negras). La flecha roja señala un ejemplo de polimorfismo dentro de la población.





**Fig. 8.** Amplificación por medio de ISSR para individuos de la población Huilotepec (PAR4) (*ssp. parviglumis*). Iniciador 827. En cada carril se visualiza un individuo de la población con múltiples bandas amplificadas. En el centro y en los extremos tres marcadores de peso molecular (L). Los loci considerados van de 370 hasta 970 pares de bases (flechas negras). La flecha roja señala un ejemplo de polimorfismo dentro de la población



**Fig. 9.** Amplificación por medio de ISSR para individuos de la población Puruándiro (MEX3) (*ssp. mexicana*). Iniciador 841. En cada carril se visualiza un individuo de la población con múltiples bandas amplificadas. En los extremos dos marcadores de peso molecular (L). Los loci considerados van de 280 hasta 1090 pares de bases (flechas negras). La flecha roja señala un ejemplo de polimorfismo dentro de la población

### Diversidad genética por marcador

De los cinco iniciadores utilizados, tres (841, 827 y 810) tuvieron todos sus marcadores polimórficos cuando se compararon entre poblaciones (con un criterio del 95%), mientras que el iniciador 809 presentó el menor valor con un 92.3% de marcadores polimórficos. Por otro lado, los iniciadores 841 y 809 presentaron el mayor y menor valor de heterocigosis esperada respectivamente, mientras que el 827 fue el más diverso

si consideramos el índice de Shannon. Todos estos valores se encuentran resumidos en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Valores de diversidad genética  $H_e$ ,  $I$  (índice de Shannon) y  $P$  (porcentaje de polimórfico) obtenidos para cada uno de los cinco iniciadores, a través de la amplificación de 10 poblaciones de teocintle, incluyendo dos supuestas subespecies y cuatro supuestas razas

Primer (iniciador)	Número de bandas (loci)	$H_e$	$I$	$P$ (criterio del 95%)
841	24	0.3467	0.5167	100
827	22	0.3357	0.5317	100
811	30	0.3026	0.4865	96.66
810	25	0.2898	0.4821	100
809	39	0.2757	0.4444	92.3
		$\bar{H}_e=0.3101$	$\bar{I}=0.4923$	$\bar{P}=97.79$

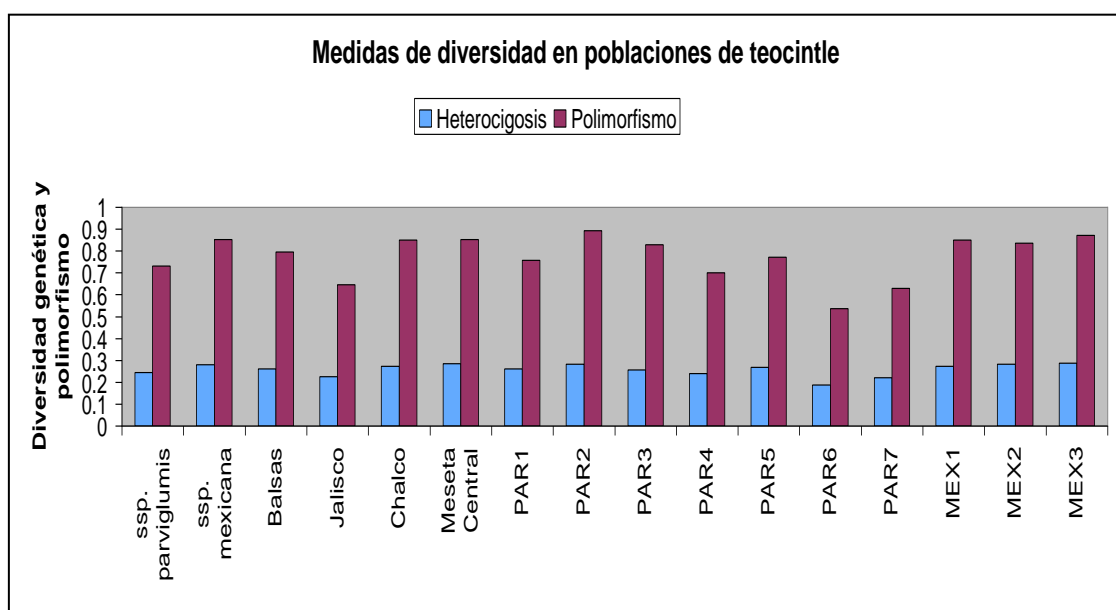
### Frecuencias alélicas

Se determinaron las frecuencias alélicas para todas las poblaciones en conjunto, para cada subespecie (*Z. mays* ssp. *parviglumis* y *Z. mays* ssp. *mexicana*) por separado y para cada una de las poblaciones de manera independiente. Todas ellas pueden ser consultadas en los Apéndices IV y V; donde además se presenta el resultado, para cada loci, de la prueba de diferenciación de Raymond y Rousset (1995). De esta prueba se establece que 136 de los 140 loci tuvieron diferencias significativas en sus frecuencias alélicas ( $P < 0.05$ ) a través de las poblaciones de teocintle. Cuando se compararon entre las subespecies, únicamente 56 loci tuvieron diferencias significativas, mientras que cuando se consideraron las subespecies por separado, 128 loci tuvieron diferencias significativas entre las poblaciones de *Z. mays* ssp. *parviglumis* y 63 loci las tuvieron entre las poblaciones de *Z. mays* ssp. *mexicana*.

### Medidas de variación genética

Se obtuvo un porcentaje de loci polimórficos ( $P$ ) de 97.79% (con el criterio del 95%) y una heterocigosis de  $H_I=0.3096$  (95% de confianza) para ambas subespecies juntas mediante el método de Lynch y Milligan (1994). A modo de comparación, y utilizando el método bayesiano implementado en el programa Hickory v1.1 (Holsinger y Lewis, 2003-2007), se obtuvo una heterocigosis total  $H_I=0.3593$  para ambas subespecies juntas.

Aunado a esto, se obtuvo un valor para el índice de Shannon ( $I$ ) de 0.4863 mediante el método de Shannon-Wiever (1949 en Yeh *et al.*, 1997).



**Fig. 10** Valores de diversidad en las diferentes poblaciones, razas y subespecies de teocintle obtenidos mediante el uso de cinco marcadores dominantes. PAR1=Tecoanapa, PAR2=Chilpancingo, PAR3=Teloloapan, PAR4=Huilotepic, PAR5=Tolimán, PAR6=Villa purificación, PAR7=Telpitita, MEX1=Villa seca, MEX2=Sta. Ana Maya y MEX3=Puruándiro.

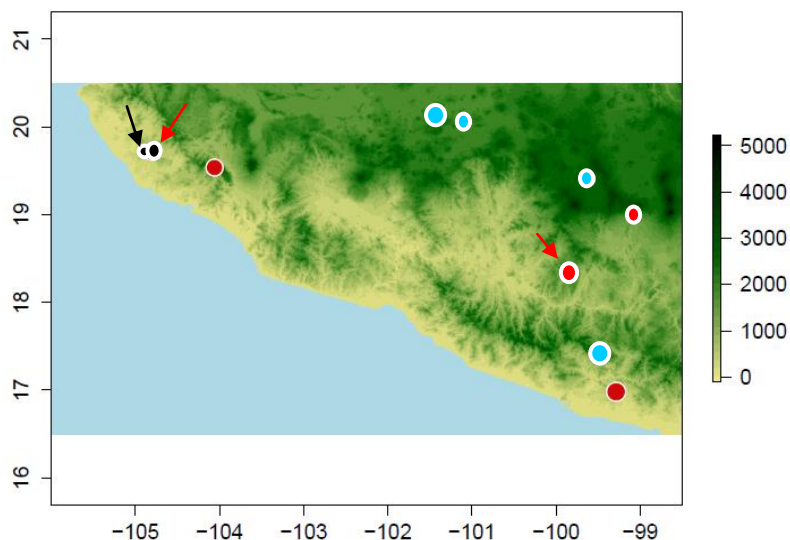
Los parámetros anteriores se obtuvieron también por población, subespecie y raza (Tabla 3 y Fig. 10). Los valores de  $I$ ,  $H_e$  y  $P$  no están sesgados por el tamaño de muestra ( $N$ ) de acuerdo al análisis de correlación de Pearson. Este resultó no-significativo para los valores de  $H_e$  ( $r=0.519$ ,  $P=0.125$ ) y  $P$  ( $r=0.493$ ,  $P=0.148$ ) obtenidos por el programa TFPGA v1.1, así como para el índice de Shannon ( $r=0.504$ ,  $P=0.069$ ) y para el valor de  $H_e$  ( $r=0.043$ ,  $P=0.906$ ) arrojado por el programa Hickory v1.1 (Holsinger y Lewis, 2003-2007).

En cuanto a su diversidad genética, tanto para la heterocigosis ( $H_e$ ) como para el índice de Shannon ( $I$ ), la mayoría de las poblaciones de teocintle no mostraron diferencias significativas entre sí ( $P<0.05$ ), salvo ciertas excepciones. Por ejemplo, la población PAR6 Villa Purificación, que presentó los valores más bajos de diversidad (Tabla3; Figs. 10 y 11), mostró diferencias significativas con casi todas las poblaciones, excepto con la más cercana PAR7 Telpitita, y con la población PAR4 Huilotepic de la zona del Balsas. Otra diferencia significativa ( $P<0.05$ ) se presentó entre la población MEX3 Puruándiro, (que exhibe el valor más alto de heterocigosis entre las poblaciones) y la población PAR7 Telpitita. En cuanto al porcentaje de loci polimórficos y diversidad

genética (índice de Shannon), la población PAR2 Chilpancingo presentó los valores más altos ( $P= 89.28\%$  e  $I=0.4386$ ).

**Tabla 3.** Parámetros de variación genética y tamaño de muestra asociados a poblaciones, razas y subespecies de teocintle, obtenidos mediante un método bayesiano (Hickory v1.1) y métodos no-bayesianos (TFPGA v1.3 y Popgene v1.31)

Población	Municipio	raza	$H_e$ (TFPGA v.1.3)	$H_e$ (Hickory v1.1)	% $P$ (TFPGA v.1.3)	Índice de Shannon (Popgene v1.31)	N
PAR1	Tecoanapa	Balsas	0.2619	0.2931	75.7	0.4023	33
PAR2	Chilpancingo	Balsas	0.2821	0.3203	89.3	0.4386	30
PAR3	Teloloapan	Balsas	0.2570	0.2957	82.9	0.4016	30
PAR4	Huiloatepec	Balsas	0.2406	0.2756	70.0	0.3742	24
<b>Raza Balsas</b>			<b>0.2827</b>	<b>0.3400</b>	<b>90.7</b>	<b>0.4478</b>	<b>117</b>
PAR5	Tolimán	Jalisco	0.2676	0.2970	77.1	0.4085	30
PAR6	Villa Purificación	Jalisco	0.1866	0.2309	53.6	0.2828	20
PAR7	Telpitita	Jalisco	0.2205	0.2405	62.9	0.3327	30
<b>Raza Jalisco</b>			<b>0.2895</b>	<b>0.3206</b>	<b>86.4</b>	<b>0.4489</b>	<b>80</b>
<i>Z. mays ssp. parviglumis</i>			<b>0.2999</b>	<b>0.3553</b>	<b>94.3</b>	0.4798	<b>197</b>
MEX1	Villa Seca	Chalco	0.2734	0.3146	85.0	0.4240	27
<b>Raza Chalco</b>			<b>0.2734</b>	<b>0.3146</b>	<b>85.0</b>	<b>0.4240</b>	<b>27</b>
MEX2	Sta. Ana Maya	Meseta central	0.2828	0.3188	83.6	0.4351	24
MEX3	Puruándiro	Meseta central	0.2876	0.3243	87.1	0.4440	30
<b>Meseta Central</b>			<b>0.2947</b>	<b>0.3535</b>	<b>87.1</b>	<b>0.4568</b>	<b>54</b>
<i>Z. mays ssp. mexicana</i>			<b>0.2984</b>	<b>0.3563</b>	<b>92.9</b>	0.4647	<b>81</b>
			$H_t$	$H_t$	% $P$	$I$	
Total			<b>0.3050</b>	<b>0.3593</b>	<b>97.8</b>	<b>0.4863</b>	<b>278</b>



**Fig. 11.** Localización geográfica, diversidad genética y altitud en poblaciones de teocintle. Los círculos indican la localización de las poblaciones. El color refleja el nivel de diversidad genética en las poblaciones (por rangos); en azul las poblaciones más diversas, seguidas de aquellas en rojo y negro sucesivamente. La barra en el extremo izquierdo indica la altitud asociada a las regiones geográficas y a las poblaciones muestreadas. El tamaño de cada círculo refleja el tamaño de la muestra. La flecha negra indica la población significativamente menos diversa con respecto de las poblaciones restantes, exceptuando dos (flechas rojas), de las que no difiere en forma significativa.

### **Diversidad genética entre subespecies y razas de teocintle**

Se llevaron a cabo análisis con la prueba de  $t$  de Student y ANOVA para determinar diferencias entre los valores de heterocigosis y porcentaje de loci polimórficos entre subespecies ( $t = 0.098$ ,  $P_{(g,l=278 ; a=0.05)} = 0.922$ ;  $t = -1.679$ ,  $P_{(g,l=8 ; a=0.05)} = 0.132$ ) y entre las cuatro razas de teocintle ( $F = 0.546$ ,  $P_{(g,l=559 ; a=0.05)} = 0.651$ ;  $F = 2.782$ ,  $P_{(g,l=9 ; a=0.05)} = 0.132$ ). Los mismos pruebas se realizaron considerando el índice de Shannon ( $t = 0.771$ ,  $P_{(g,l=278 ; a=0.05)} = 0.465$ ;  $F = 0.654$ ,  $P_{(g,l=559 ; a=0.05)} = 0.557$ ). Todos los análisis determinaron que las diferencias no son significativas.

#### ***Zea mays ssp. parviglumis***

Dentro de esta subespecie, la población PAR2 (Chilpancingo) presentó el mayor valor para todos los parámetros de diversidad, mientras que la población PAR6 (Villa Purificación) tuvo los valores más bajos. Considerando el agrupamiento por razas dentro de esta subespecie, ambas razas (Jalisco y Balsas) presentaron niveles de diversidad similares (Tabla 3; figs. 10 y 11).

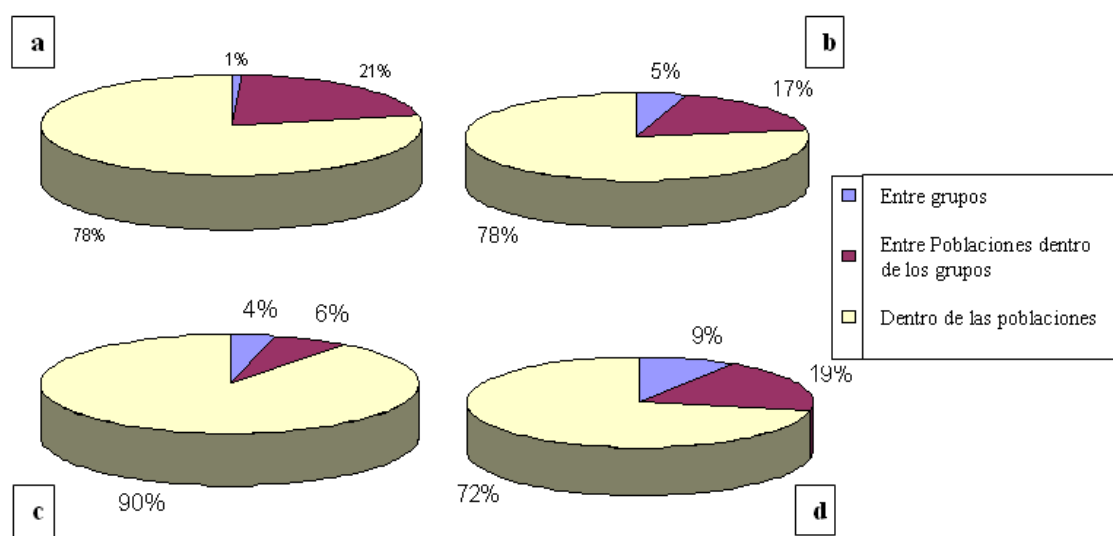
#### ***Zea mays ssp. mexicana***

Para *Z. mays ssp. mexicana*, MEX3 (Puruándiro) y MEX1 (Villa Seca) representan las poblaciones con el mayor y menor valor, para todos los parámetros, respectivamente, excepto para el porcentaje de loci polimórficos, donde MEX2 Sta. Ana Maya presentó el menor valor. Al considerar el agrupamiento por razas dentro de esta subespecie, la raza Meseta Central tuvo los mayores niveles de diversidad genética en comparación con la raza Chalco (Tabla 3; figs. 10 y 11).

### **Análisis Molecular de varianza (AMOVA)**

El AMOVA realizado entre subespecies (Fig. 12a) reveló que la mayor parte de la variación genética se presenta dentro de las poblaciones (78.35 %), un porcentaje menor se encuentra entre las poblaciones de cada subespecie (20.92%) y una fracción no significativa (0.72%) entre subespecies. Resultados similares se presentaron para el agrupamiento según la raza (Fig. 12b), mostrando un mayor porcentaje de variación dentro de las poblaciones (77.79%) y uno más bajo entre las poblaciones de cada raza (17.36%) y entre razas (4.86%) (no significativo,  $P = 0.052$ ). En cuanto al agrupamiento por razas dentro de cada subespecie se observó el mismo patrón (Figs. 12c y 12d),

donde el porcentaje de variación entre razas de la *ssp. mexicana* no resultó significativo ( $P=0.3196$ ). La tabla resumen de AMOVA esta incluida en el apéndice VI.

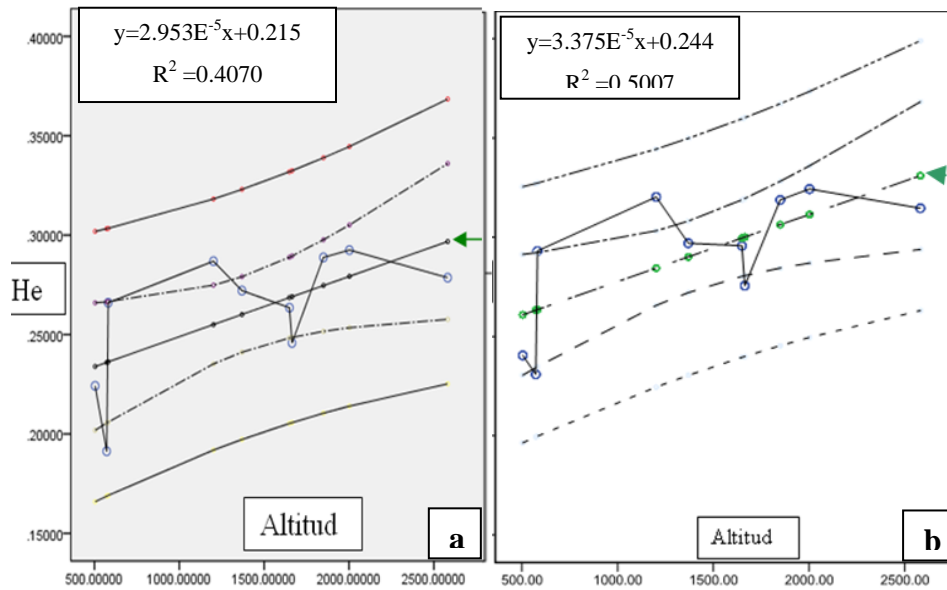


**Fig. 12.** Distribución de la variación genética (en porcentaje) mediante el método AMOVA para diferentes agrupamientos de las diez poblaciones de teocintle analizadas. Poblaciones agrupadas por: a) subespecie; b) razas; c) razas dentro de la *ssp. mexicana* y d) razas dentro de la *ssp. parviglumis*.

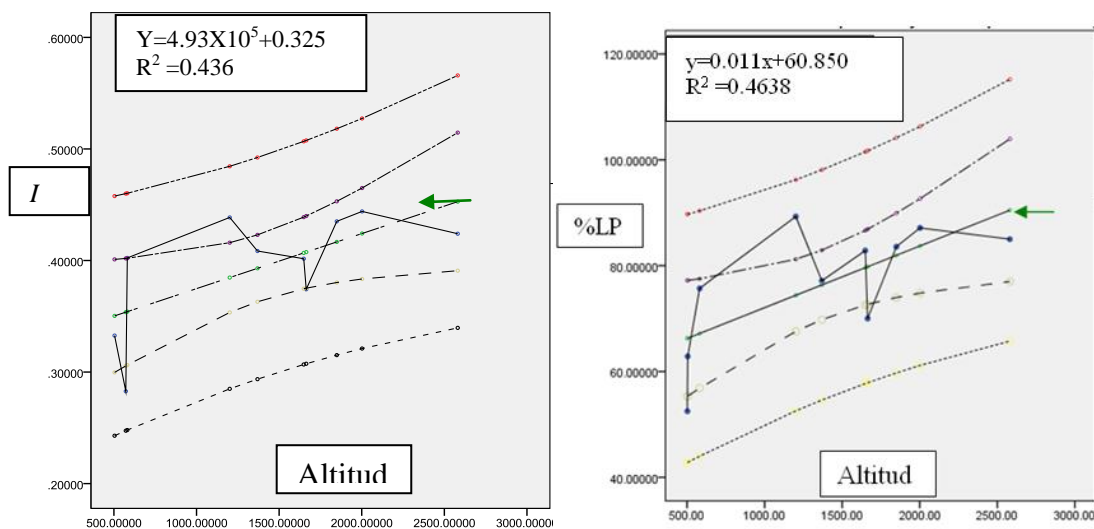
### Diversidad y altitud

El análisis de regresión lineal para las variables altitud y heterocigosis esperada ( $H_e$ ) fue significativo ( $F=5.496$ ,  $P_{(g,l=9; a=0.05)}=0.047$ ), indicando que a mayor altitud se presentan mayores niveles de variación genética (Fig. 13a). El mismo resultado se obtuvo cuando relacionamos el porcentaje de loci polimórficos ( $F=6.934$ ,  $P_{(g,l=9; a=0.05)}=0.030$ ) (Fig. 14b) y el índice de Shannon ( $F=6.182$ ,  $P_{(g,l=9; a=0.05)}=0.038$ ) con la altitud (Fig. 14a). Los resultados obtenidos con el programa Hickory v1.1 (Fig. 13b) mostraron patrones idénticos ( $F=8.021$ ,  $P_{(g,l=9; a=0.05)}=0.022$ ). Estos mismos análisis no fueron significativos cuando se analizaron separadamente las poblaciones de la *ssp. mexicana* ( $F=2.806$ ,  $P_{(g,l=2; a=0.05)}=0.343$ ), y de la *ssp. parviglumis* ( $F=1.686$ ,  $P_{(g,l=6; a=0.05)}=0.251$ ).

Las correlaciones entre los parámetros de diversidad y los valores de latitud y longitud no resultaron significativas ( $P>0.05$ ) con los valores obtenidos con el programa TFPGA v1.3, ni para todas las poblaciones, ni para cada subespecie por separado. Sin embargo, la correlación entre heterocigosis y longitud (considerando el total de poblaciones) resultó marginalmente significativa cuando se consideraron los valores obtenidos mediante aproximación bayesiana ( $r=0.639$ ,  $P=0.047$ ), indicando que estos aumentan hacia el este de la distribución.



**Fig. 13.** Regresión lineal para la relación entre heterocigosis ( $H_e$ ) y altitud considerando ambas subespecies de teocintle (el total de poblaciones). Se ilustra la relación para los valores obtenidos mediante: a) TFPGA v1.3 y b) Hickory v1.1. También se ilustran los intervalos de confianza derivados del análisis. La flecha verde indica la línea de regresión y los círculos azules los valores observados en las poblaciones. Se presentan además la ecuación de la regresión y el valor de  $R^2$  (coeficiente de determinación).



**Fig. 14.** Regresión lineal para la relación entre altitud y dos medidas de variación genética: índice de Shannon y porcentaje de loci polimórficos. Se consideran ambas subespecies de poblaciones de teocintle (el total de poblaciones). También se ilustran los intervalos de confianza derivados del análisis. La flecha verde indica la línea de regresión y los círculos azules los valores observados en las poblaciones. Se presentan además la ecuación de la regresión y el valor de  $R^2$  (coeficiente de determinación).

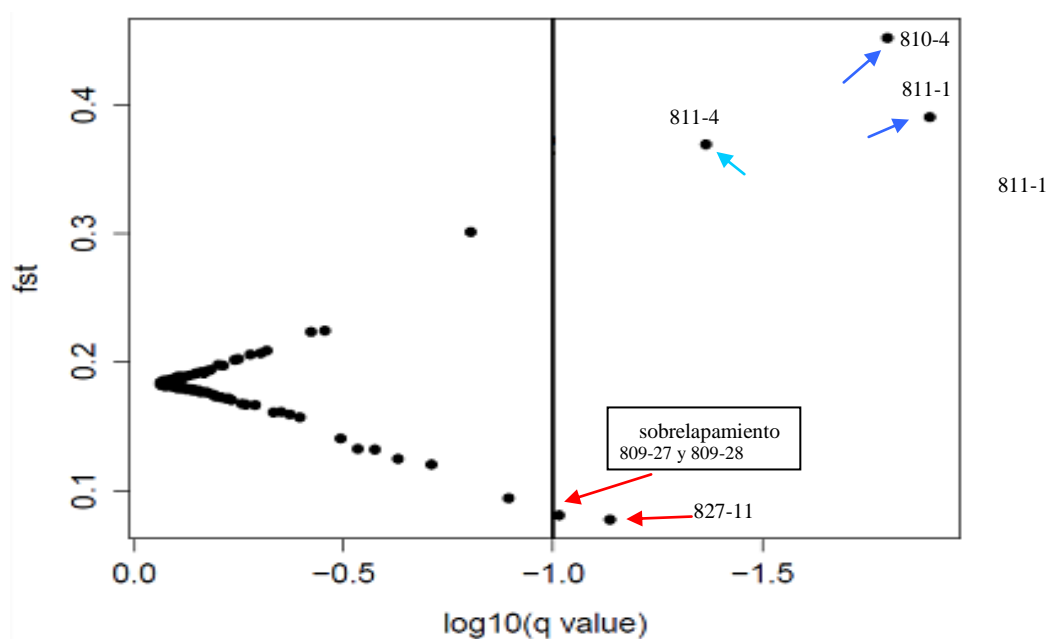
### Identificación de loci candidatos a patrones de selección

Seis de los 140 loci analizados (4%) se desviaron significativamente de los patrones esperados bajo un modelo neutral (Fig. 15). Dos de ellos (811-1 y 810-4) mostraron evidencia “muy fuerte” y uno (811-4) evidencia “sustancial” de estar sujetos a selección direccional de acuerdo a la escala de interpretación de Jeffreys (1961 en Foll y



Gaggiotti, 2008, ver Apéndice IX). Por otra parte, otros dos marcadores (809-27 y 827-11) presentaron evidencia “sustancial”, y uno (809-28) evidencia muy débil (aunque significativa) de estar sujetos a selección balanceadora, de acuerdo a la misma escala de interpretación. Los valores de probabilidad posterior para cada locus se presentan en el apéndice VIII.

Dos de los tres loci con señales de selección direccional se correlacionaron negativamente y de manera significativa con la altitud ( $r=-0.685$ ,  $P=0.014$  y  $r=-0.651$ ,  $P=0.021$ ), mientras aquellos sometidos a selección balanceadora no se correlacionaron significativamente con este factor ( $r=0.128$ ,  $P=0.362$ ,  $r=-0.323$ ,  $P=0.182$ ,  $r=-0.392$ ,  $P=0.131$ ).



**Fig. 15.** Identificación de loci potencialmente sujetos a selección natural a través del análisis de 140 loci de 10 poblaciones de teocintle mediante el programa BayeScan (Foll y Gaggiotti, 2008). El eje horizontal representa el criterio de decisión para considerar loci candidatos (en este caso el 10% de los candidatos encontrados se consideraron falsos positivos). Los puntos ubicados a la izquierda de la línea de referencia representan loci cuyas diferencias en frecuencias alélicas entre poblaciones pueden explicarse mediante procesos demográficos (sin considerar a la selección). Los puntos señalados con flechas azules ubicados a la derecha de la línea de referencia (con sus respectivos nombres) son loci con señales de selección direccional, mientras los señalados con flechas rojas son loci con señales de selección balanceadora. El cuadro de texto indica un sobreapamiento de dos puntos (loci) potencialmente sujetos a selección balanceadora. Las flechas en azul oscuro indican loci significativamente correlacionados con la elevación sobre el nivel del mar.

### Estructura genética en poblaciones de teocintle

El valor promedio del coeficiente de ancestría ( $\theta$ ) (equivalente a la  $F_{ST}$ ) para el total de las poblaciones y para el total de loci fue de 0.1837, con un valor mínimo de 0.1591 y un máximo de 0.2096. A nivel de agrupamientos, la mayor estructuración se presentó entre las razas (0.007) de teocintle, en comparación con la encontrada entre las subespecies (-0.0074). Por otra parte, a nivel de subespecie, *Z. mays* ssp. *parviglumis*



presentó una mayor estructuración entre sus poblaciones (0.2145), en tanto que *Z. mays* ssp. *mexicana* tuvo un valor relativamente bajo (0.0688). Considerando el agrupamiento por razas, las poblaciones de la Meseta Central presentaron baja estructura (0.0482) lo cual también se observó en la raza Balsas (0.0968). La raza Jalisco, al contrario de las anteriores, tuvo el valor más alto de estructura (0.2859) entre sus poblaciones (Tabla 4).

**Tabla 4.** Estructura genética entre y dentro de subespecies y razas de teocintle expresada mediante el estadístico  $\theta$  (coeficiente de ancestría), calculado a partir de la implementación de cinco marcadores de ISSR y métodos de análisis bayesianos (Hickory v.1) y no-bayesianos (TFPGA v1.3)

Grupo	Theta $\theta$ ( $\pm$ S.D)	( $\theta$ II)
	TFPGA v1.3.	Hickory v.1
<i>Z. mays</i> ssp. <i>parviglumis</i>	0.2145 (0.0162)	0.2589 (0.0177)
<i>Z. mays</i> ssp. <i>mexicana</i>	0.0688 (0.0082)	0.1131 (0.0199)
<b>ssp. <i>parviglumis</i> vs ssp. <i>mexicana</i></b>	<b>-0.0074 (0.0082)</b>	<b>0.0999 (0.0271)</b>
Balsas	0.0968 (0.0092)	0.1467 (0.0188)
Jalisco	0.2859 (0.0273)	0.3298 (0.0254)
Meseta Central (MC)	0.0482 (0.0082)	0.1011 (0.0231)
<b>Balsas vs Jalisco vs MC vs Chalco</b>	<b>0.007 (0.0116)</b>	<b>0.1333 (0.0213)</b>
<b>Total</b>	<b>0.1837 (0.0129)</b>	<b>0.2194 (0.0163)</b>

Por otra parte, el método bayesiano arrojó un valor de  $\theta = 0.2194$  con un valor mínimo de 0.1868 y uno máximo de 0.2506. En cuanto a la estructura dentro de los grupos, se observó el mismo patrón que el obtenido con el con método anterior; sin embargo, es oportuno mencionar que los valores de estructura genética aumentaron considerablemente con el método bayesiano (Tabla 4). Los resultados obtenidos cuando se excluyeron las poblaciones de la zona de solapamiento muestran valores de estructura entre subespecies (-0.0270) y entre razas (0.0046) similares a los obtenidos con el programa TFPGA v1.3..

### Distancia genética

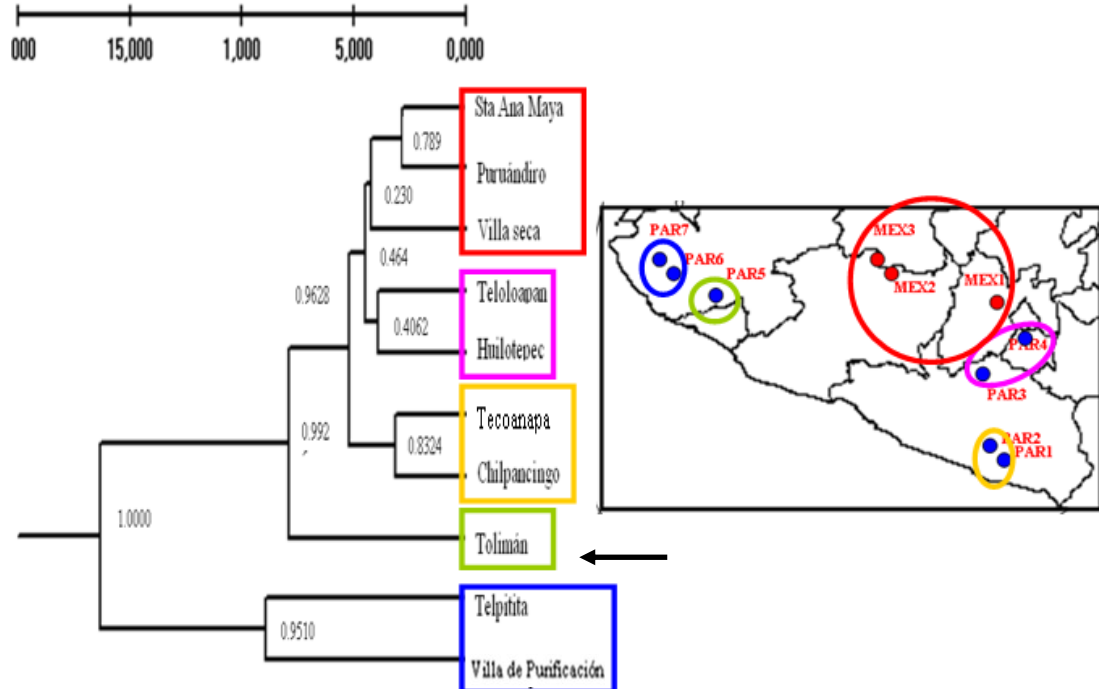
Considerando todas las poblaciones juntas, y de acuerdo a la matriz de distancias genéticas (Tabla 5), las poblaciones más cercanas genéticamente fueron MEX2 Sta. Ana Maya y MEX3 Puruándiro (0.029) pertenecientes a la raza Meseta Central. Las más alejadas fueron Huilotepec y Villa Purificación (0.214) pertenecientes, la primera, a la raza Balsas y, la segunda, a la raza Jalisco. El promedio de las distancias genéticas entre

las poblaciones fue de 0.094. Considerando las subespecies por separado, las poblaciones de la ssp. *parviglumis* presentaron un promedio ( $D$ ) de 0.111, mientras para aquellas pertenecientes a la ssp. *mexicana* fue de 0.0377.

**Tabla 5.** Matriz de distancias genéticas [distancia original de Nei (1972)] y geográficas pareadas para las 10 poblaciones de teocintle estudiadas (ver tabla 1 para abreviaciones). Distancias genéticas obtenidas mediante el uso de cinco *primers* de ISSRs y 140 loci .

		Distancia Geográfica								
	PAR1	PAR2	PAR3	PAR4	PAR5	PAR6	PAR7	MEX1	MEX2	MEX3
PAR1	0	168367	468717	440298	5732409	597857	5934047	52539	269189	2421616
PAR2	0.031	0	30.1137	27.7575	559.747	584343	5798892	37545	254157	227081
PAR3	0.052	0.044	0	13.0973	533.9683	558516	5540633	23823	226236	1991348
PAR4	0.065	0.043	0.039	0	544.7387	569256	5648051	12415	235887	2088159
PAR5	0.077	0.076	0.067	0.093	0	24.6349	20.1913	547.8245	312.0734	338.3138
PAR6	0.212	0.207	0.186	0.214	0.199	0	4.454	572.284	336.278	362.6037
PAR7	0.135	0.117	0.11	0.142	0.125	0.089	0	567.8376	331.857	358.1734
MEX1	0.076	0.059	0.044	0.05	0.091	0.197	0.135	0	237.635	210.6753
MEX2	0.053	0.045	0.051	0.051	0.072	0.197	0.135	0.046	0	27.1015
MEX3	0.05	0.034	0.039	0.036	0.078	0.185	0.118	0.038	0.029	0

- Los valores en oscuro (por arriba de la diagonal) representan las distancias geográficas (km) mientras los ubicados por debajo de ésta representan las distancias genéticas. El valor en azul representa la mayor distancia genética, mientras aquel en rojo indica el valor más bajo.

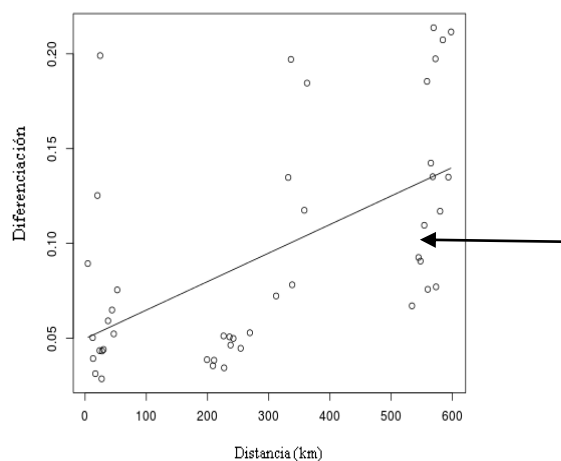


**Fig. 16.** Agrupación de las diez poblaciones de teocintle mediante el método de UPGMA a partir de la amplificación de cinco marcadores dominantes. La parte izquierda refleja las relaciones genéticas entre las poblaciones a partir de la distancia original de Nei (1972). En cuadros de colores se resaltan los principales grupos formados. La parte derecha de la figura relaciona los principales grupos con la ubicación geográfica de las poblaciones. Los círculos azules representan poblaciones de *Z. mays* ssp. *parviglumis* mientras los rojos representan poblaciones de la ssp. *mexicana*. La flecha negra destaca la posición de la población Tolimán PAR5 más parecida a poblaciones lejanas que a sus vecinas. Los valores de soporte (mediante “bootstrap”) para cada nodo se muestran delante de ellos

El dendrograma basado en el método UPGMA correspondiente al total de las poblaciones (Fig. 16), permite observar que aquellas que conforman la *ssp. mexicana* forman un grupo incluido en otro que se compone de algunas poblaciones de la *ssp. parviglumis* (raza Balsas); es decir, que las dos subespecies no forman grupos bien diferenciados genéticamente. En cuanto a la *ssp. mexicana*, se pueden observar que las poblaciones ubicadas en la Meseta Central se agrupan claramente, diferenciándose de la población de Chalco. Por otro lado, en la *ssp. parviglumis* se observan dos grupos bien soportados en la región del Balsas (Tecoanapa-Chilpancingo y Teloloapan- Huilotepec), los cuales a su vez se encuentran diferenciados de las poblaciones ubicadas en el estado de Jalisco. La población PAR5 Tolimán perteneciente a la raza Jalisco es, sin embargo, más cercana genéticamente al grupo del Balsas que a sus poblaciones vecinas de Jalisco, que forman otro grupo bien soportado. El patrón general es que las relaciones genéticas parecen corresponder con la cercanía geográfica entre las poblaciones.

### Aislamiento por distancia

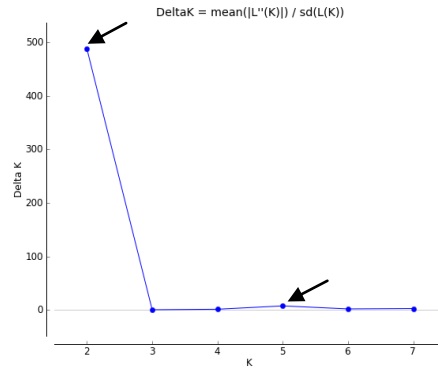
La prueba de Mantel resultó significativa para el total de poblaciones analizadas ( $r=0.57$ ,  $P= 0.0007$ ), sugiriendo que existe un patrón de aislamiento por distancia. La Figura 17 ilustra este patrón. Para las subespecies por separado, la prueba arrojó resultados contrastantes. Por un lado la prueba resultó no significativa para la *ssp. mexicana* ( $r=0.94$   $P=0.334$ ), caso contrario a lo obtenido para la *ssp. parviglumis* ( $r=0.51$ ,  $P=0.001$ ).



**Fig. 17.** Patrón de aislamiento por distancia en poblaciones de teocintle obtenido mediante la Prueba de Mantel (1995). El eje horizontal indica la distancia geográfica entre poblaciones, mientras el eje vertical indica la diferenciación genética [distancia genética de Nei (1972)] entre ellas. La línea (flecha negra) ilustra la relación lineal entre las variables. Los círculos indican los valores pareados observados entre poblaciones de teocintle para las variables analizadas.

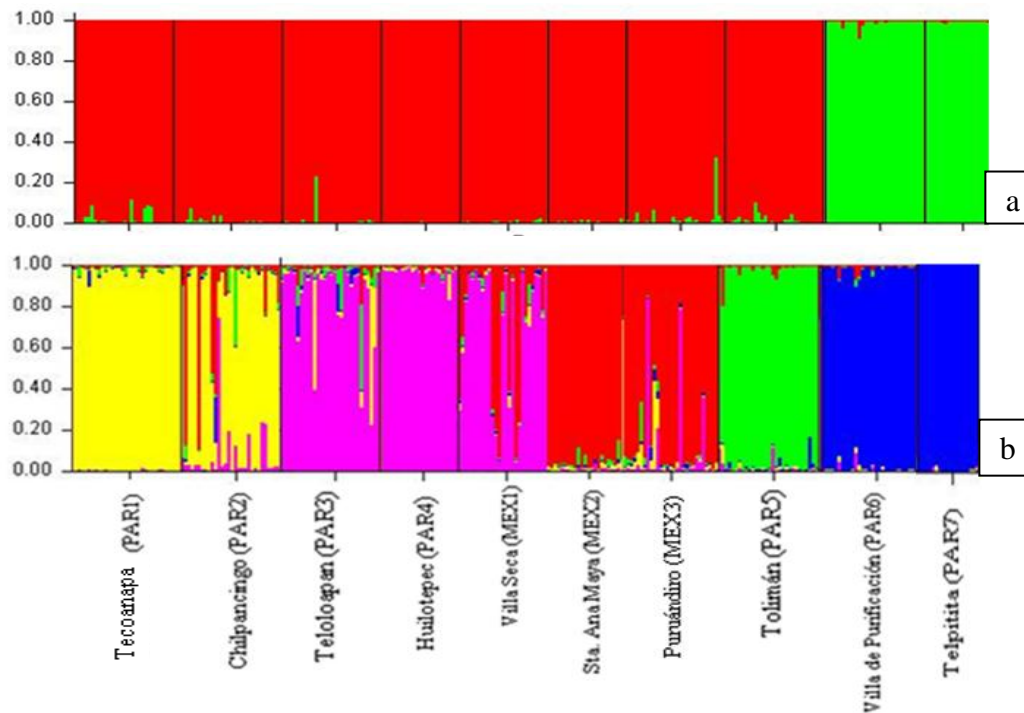
## Agrupamiento bayesiano de poblaciones

Los valores con mayor probabilidad para agrupar el total de poblaciones fueron 2 y 5 grupos, siendo el primero el de mayor verosimilitud (Fig. 18). La proporción de alelos pertenecientes a cada grupo se presenta en el Apéndice VII.



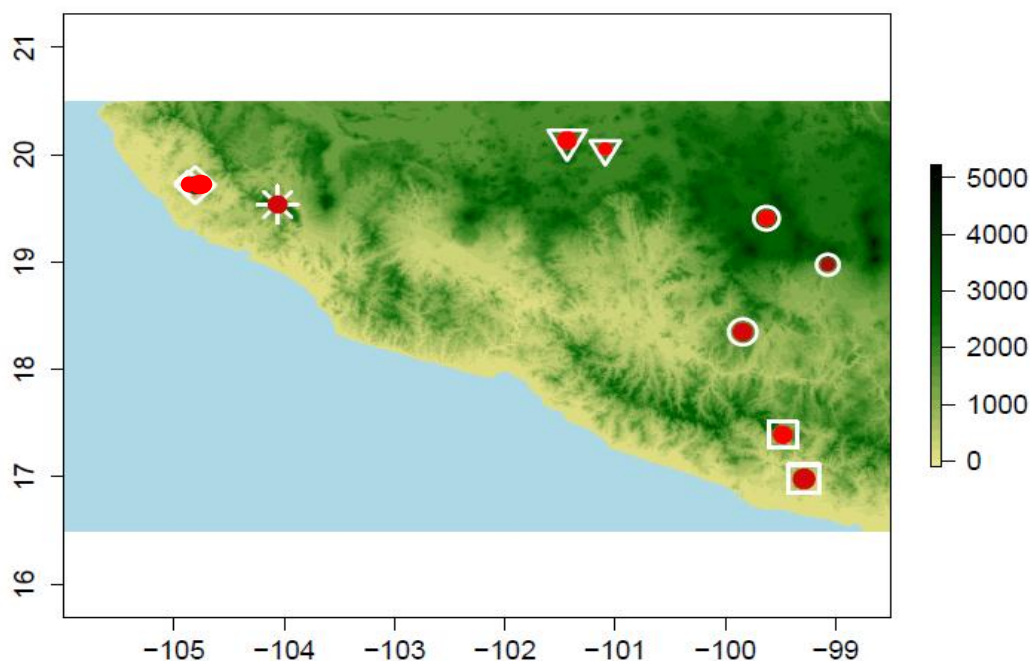
**Fig. 18.** Método de Evanno *et al.* (2005) para la determinación del número de grupos con mayor verosimilitud considerando el total de poblaciones de teocintle. El gráfico presenta el valor modal (Delta K) de las diferencias sucesivas de verosimilitud para diferente número de grupos (K), indicando los valores con mayor probabilidad y menor error asociado (flechas).

Las poblaciones Villa Purificación (PAR6) y Telpitita (PAR7), cercanas geográficamente entre sí y ubicadas en el estado de Jalisco formaron un primer cluster, mientras el otro grupo esta conformado por las poblaciones restantes (Fig. 19a). Aquí, las poblaciones no se separan de acuerdo a su pertenencia a determinada subespecie.



**Fig. 19.** Agrupamiento de las poblaciones de teocintle basado en el método de Evanno *et al.* (2005) y por medio del programa Structure v.2.3.4. Los datos utilizados se derivan de la amplificación de cinco marcadores ISSRs. Se muestran las 10 poblaciones agrupadas en 2 (a) y 5 (b) grupos, es decir, aquellos que presentaron la mayor verosimilitud. Los grupos se representan mediante colores.

Por otra parte, el análisis Structure para 5 grupos reveló que estos están conformados de la siguiente manera: el primero incluye las poblaciones del sur de Guerrero (PAR1 Tecoaapa y PAR2 Chilpancingo), el segundo las ubicadas al norte de Guerrero, Morelos y Estado de México (PAR3 Teloloapan, PAR4 Huilotepec y MEX1 Villa Seca), el tercero aquellas del norte de Michoacán (MEX2 Sta. Ana Maya y MEX3 Puruándiro), el cuarto las ubicadas al suroeste de Jalisco (PAR6 Villa purificación y PAR7 Telpitita), el quinto incluye una sola población, Tolimán (PAR5), ubicada al sur de Jalisco (Fig. 19b y 20). A excepción de esta última, los grupos están conformados por poblaciones cercanas geográficamente, independientemente de la subespecie a la que pertenecen. En otras palabras, las subespecies no están reflejadas en los grupos genéticos.

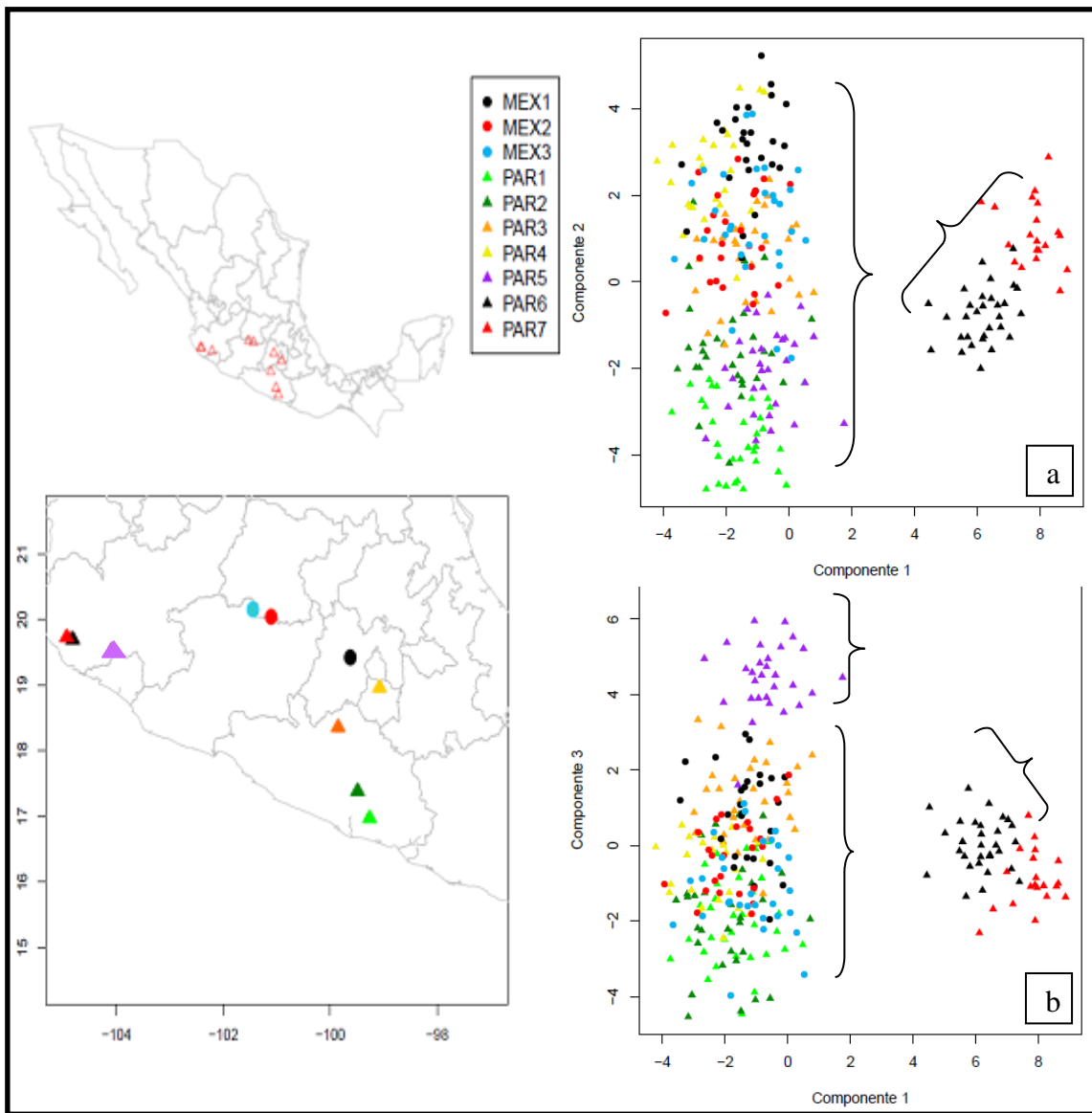


**Fig. 20.** Agrupación de las diez poblaciones de teocintle mediante el método de Evanno *et al.* (2005). Se presentan los grupos para  $k=5$  (segundo agrupamiento con mayor probabilidad asociada). Los diferentes símbolos que rodean a las poblaciones (círculos) reflejan la pertenencia de éstas a diferentes grupos genéticos. El tamaño de los círculos refleja el tamaño de la muestra. La barra en el extremo izquierdo indica la altitud asociada a las regiones geográficas y a las poblaciones muestreadas.

### **Análisis de componentes principales**

Se utilizaron los tres primeros componentes (que explican un 21% de la varianza total) para agrupar las poblaciones de teocintle. Las gráficas (Fig. 21a y 21b) ilustran claramente la formación de grupos entre las poblaciones. Cuando se analiza la relación entre los componentes 1 y 2 (16.54% de la varianza), se observa el mismo patrón obtenido mediante Structure, con un grupo compuesto por las poblaciones del municipio de Villa Purificación (PAR6 Villa Purificación y PAR7 Telpitita) y otro

grupo formado por las restantes (Fig. 21a). Por otra parte, cuando se analiza la relación entre los componentes 1 y 3 (16.06% de la varianza), es clara la formación de un tercer grupo, compuesto por una sola población, PAR5 Tolimán, en el sur del estado de Jalisco (Fig. 21b). Como en resultados anteriores, los grupos formados no reflejan en sus relaciones diferencias genéticas claras entre las subespecies de teocintle. En vez de ello, las relaciones parecen exhibir una correspondencia con la distribución geográfica de las poblaciones.



**Fig. 21.** Análisis de componentes principales considerando el total de poblaciones y la amplificación con cinco marcadores ISSRs. Las gráficas ilustran la formación de grupos genéticos mediante la relación entre los componentes: a) 1 y 2, y b) 1 y 3. Las poblaciones se representan mediante distintos colores y símbolos. En el mapa se ilustra el símbolo de referencia para cada población. Los corchetes señalan los grupos diferenciados.

## Discusión

Para este tipo de marcador (ISSR) y dentro del género *Zea*, el presente estudio es el único que ha trabajado con el grupo de los teocintles y el que analiza la mayor cantidad de individuos (n=278)(Ver tabla 6). Otros estudios han trabajado sobre maíz doméstico (*Zea mays ssp. mays*) y están enfocados en la evaluación de diferencias a nivel molecular entre cultivos, variedades o razas de maíz. En todos ellos se ha trabajado con accesiones y no con poblaciones como material biológico, por lo cual no se presentan análisis propios de genética de poblaciones. Ante esto, únicamente el porcentaje (total, por grupos y por marcador) de loci polimórficos como parámetro de variación genética puede ser comparable entre sus resultados y los aquí obtenidos. Sin embargo, considerando que éste es un parámetro sesgado por el tamaño de muestra (diferente en todos los estudios mencionados), el análisis comparativo puede ser engañoso. Cabría destacar en todo caso, que si bien el maíz exhibe en general menores niveles de polimorfismo que el teocintle, estos no son bajos. De hecho los niveles relativamente altos de variación genética en el maíz domesticado pueden tener una posible explicación a partir de la introgresión continua de material genético desde el teocintle (Doebley, 1990; Matsuoka *et al.*, 2002; Ellstrand *et al.*, 2007; Ross-Ibarra *et al.*, 2009; Hufford *et al.*, 2013). Otra posible explicación es el recurrente flujo genético entre razas y variedades de maíz domesticado (Baltazar y Schoper, 2002).

**Tabla 6.** Valores de polimorfismo para grupos pertenecientes al género *Zea* obtenidos a partir de estudios anteriores que implementan ISSRs como marcadores moleculares y accesiones como material biológico.

Objeto de estudio	n <sub>p</sub>	n <sub>ip</sub>	P (%)	Referencia
81 accesiones ( 79 de razas de maíz y 2 var.mejoradas)	16	116	75.8	Carvalho <i>et al.</i> , 2002
50 accesiones de maíz (palomero, común, dulce y dent), 1 accesión de teocintle y <i>tripsacum ssp.</i>	15	122	89.05	Amaral-Junior <i>et al.</i> , 2011
21 accesiones de maíz	10	108	<b>100</b>	Van Liet <i>et al.</i> , 2011
9 accesiones de maíz	8	53	69	Idris <i>et al.</i> , 2012
97 accesiones de maíz palomero y 8 de maíz Dent	10	<b>507*</b>	95	Kantety <i>et al.</i> , 1995
10 poblaciones de dos subespecies de teocintle 3 de <i>ssp. mexicana</i> y 7 de <i>ssp. parviglumis</i>	5	<b>136</b>	97.7	<b>Presente estudio</b>

\* El número de loci polimórficos fue calculado a partir del valor de P y del número de bandas totales, ya que no se presenta explícitamente en el artículo correspondiente. n<sub>ip</sub>= Número de loci polimórficos; n<sub>p</sub> =Número de *primers*; P= Porcentaje de loci polimórficos

Como dato importante, dos de los cinco iniciadores utilizados, el 810 y el 841, con altos niveles de polimorfismo, habían sido empleados en estudios anteriores que trabajaron con maíz domesticado (Amaral-Junior *et al.*, 2011; Idris *et al.*, 2012). En

estos estudios también presentaron alta variación, pero menor a la obtenida aquí, con un menor número de bandas analizadas (ver Tabla 7). La presencia de menos bandas mediante la amplificación del mismo marcador puede tener diferentes orígenes. Por una parte, las condiciones de amplificación son diferentes entre los estudios y esto puede influir en el número de bandas que se amplifican. En el mismo sentido, el criterio para considerar o no determinadas bandas en el gel no se menciona en los artículos, pudiendo descartar bandas que son consideradas aquí. Una explicación alternativa puede fundamentarse en el efecto del proceso de domesticación. El efecto de la deriva génica que aumenta durante la domesticación (Buckler y Stevens 2006; Haudry *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009) puede provocar la fijación más rápida (por azar) de mutaciones. Dado que los cebadores de ISSRs son al fin y al cabo microsatélites, esto podría derivar en la disminución de sitios de fijación y, por lo tanto, en la cantidad de bandas amplificadas en el maíz.

**Tabla 7.** Valores de polimorfismo asociados a dos marcadores ISSR utilizados en estudios dentro del género *Zea*, incluyendo los aquí obtenidos para poblaciones naturales de teocintle.

Primer	N <sub>b</sub>	N <sub>bp</sub>	P (%)	Material biológico	Referencia
810	12	11	91.66	Accesiones de maíz	Amaral-Junior <i>et al.</i> , 2011
	12	11	91.66	Accesiones de maíz	Idris <i>et al.</i> , 2012
	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>100</b>	<b>Poblaciones de teocintle</b>	<b>Presente estudio</b>
841	12	11	91.66	Accesiones de maíz	Amaral-Junior <i>et al.</i> , 2011
	9	8	88.88	Accesiones de maíz	Idris <i>et al.</i> , 2012
	<b>24</b>	<b>24</b>	<b>100</b>	<b>Poblaciones de teocintle</b>	<b>Presente estudio</b>

N<sub>b</sub>= Número de bandas N<sub>bp</sub>= Número de bandas polimórficas

### Niveles de variación y diferenciación genética en teocintle

La alta variación genética en la mayoría de las poblaciones (Tabla 3, Fig. 10) y grupos de poblaciones de teocintle ( $H_t = 0.3050$ ;  $I = 0.4863$ ;  $P = 97.7\%$ ) así como la baja estructuración entre poblaciones (exceptuando aquellas de Jalisco) pueden ser explicadas por un conjunto particular de características que son compartidas por las diferentes subespecies y razas [lo que explicaría que no haya diferencias significativas entre los niveles de diversidad de estos grupos taxonómicos].

En primer lugar, los teocintles cuentan con un genoma realmente complejo (Schnable *et al.*, 2009; Pyhäjärvi *et al.*, 2013), principalmente por la gran cantidad y actividad de elementos móviles (de diferentes familias) que por su continua inserción y duplicación pueden dar lugar a una gran variación entre individuos (Wessler, 2006). En



segundo lugar se encuentran las características de historia de vida y patrones reproductivos que presentan (Sánchez *et al.*, 1998). Características tales como un tipo de vida anual, amplia distribución y un sistema reproductivo de entrecruza (polinización abierta por viento) son asociadas a plantas que presentan niveles altos de diversidad genética entre sus poblaciones (Hamrick y Godt, 1996; Nybom, 2004).

El tipo de polinización, mediada por viento, y el sistema reproductivo de entrecruza favorecen el intercambio de material genético, incluso entre poblaciones alejadas geográficamente. Así, un factor que puede contribuir en el aumento y mantenimiento de altos niveles de diversidad, y en la baja diferenciación entre las poblaciones de teocintle es el flujo genético recurrente que parece existir entre ellas (Fukunaga *et al.*, 2005; Ross-Ibarra *et al.*, 2009; Pyhäjärvi *et al.*, 2013), fundamentado en una eficiente capacidad de dispersión. Este flujo genético entre poblaciones parece reflejarse en un patrón de aislamiento por distancia (Fig. 17), el cual también ha sido reportado en estudios anteriores (Van Heerwaarden *et al.*, 2010; Pyhäjärvi *et al.*, 2013). Bajo este patrón, las poblaciones relativamente cercanas tienden a ser más parecidas debido a una mayor probabilidad de cruzamiento, lo cual puede dar lugar al agrupamiento regional encontrado. En este sentido es interesante el caso de la población de Tolimán (PAR5), la cual es muy diferente (Fig. 16) y significativamente más diversa (0.2676) que las otras poblaciones de Jalisco (Tabla 3), a pesar de la cercanía geográfica. Es muy probable que, al contrario de sus vecinas, esta población mantenga suficiente intercambio genético con otras como para evitar el efecto del aislamiento sobre los niveles de variación genética. Este intercambio, sin embargo, parece ser muy limitado para con las demás poblaciones aquí muestreadas (posiblemente por la distancia geográfica), tal que mantiene características genéticas particulares que la ubican como un grupo único y diferente de todos los demás (Figs. 16, 19b, 20 y 21b). Es posible que poblaciones no analizadas en este estudio cumplan un papel importante en este sentido.

En cuanto al tipo de distribución, los teocintles presentan una muy amplia, la cual suele asociarse -al contrario de una endémica, regional o local- a mayores tamaños efectivos poblacionales (Godínez-Herrera *et al.*, 2009; Ross-Ibarra *et al.*, 2009), disminuyendo así el efecto de la deriva génica y la endogamia sobre los niveles de variación genética y de diferenciación entre poblaciones (Hedrick, 2005). Aquellas poblaciones ubicadas en zonas como el norte de Michoacán [considerada además el centro de diversificación de la *ssp. mexicana* (Matsuoka *et al.*, 2002)] y la zona del Balsas, que presentan aquí gran diversidad (Tabla 3, Figs. 10 y 11), han sido

identificadas como numerosas y extensas, por lo menos en el pasado relativamente reciente (Sánchez y Ruíz-Corral, 1996; Sánchez *et al.*, 1998). Cabe destacar que aunque se ha demostrado que muchas poblaciones (sobre todo en Jalisco) sí han sufrido fuertes presiones demográficas que han afectado sus niveles de variación genética (Godínez-Herrera *et al.*, 2009; Pyhäjärvi *et al.*, 2013), para otras poblaciones este no parece ser el caso (Godínez-Herrera *et al.*, 2009). De esta manera, es posible que varias de las poblaciones aquí muestreadas no hayan sido impactadas tan severamente por esa causa, logrando mantener en conjunto alta diversidad y baja diferenciación.

Otro fenómeno hipotético que podría contribuir en la baja diferenciación genética entre poblaciones es la divergencia relativamente reciente entre ellas, y/o la fundación (también reciente) de unas a partir de otras. Si este fuera el caso, el tiempo transcurrido desde la separación de las poblaciones o desde el origen de las nuevas, podría no ser suficiente para acumular cambios genéticos que deriven en alta diferenciación. Si sumado a esto, el alto potencial de dispersión favorece el intercambio genético entre las poblaciones que se separan, resulta coherente que presenten pocas diferencias. La anterior hipótesis se ha sugerido para explicar, por un lado, evidencia de mezcla genética entre las dos subespecies (Fukunaga *et al.*, 2005) y por otro, baja diferenciación entre poblaciones dentro de la subespecie *parviglumis* (Moeller *et al.*, 2007). Evidencia de fundación reciente para poblaciones de teocintle es presentada por Buckler *et al.*, (2006) quien sugiere una fundación de poblaciones en Jalisco a partir de algunas del centro del Balsas tras una colonización después del último máximo glaciar. Se deben, sin embargo, buscar otros ejemplos más recientes de divergencia y/o fundación en poblaciones de teocintle para demostrar si este tipo de procesos influyen los patrones de estructuración en ésta y otras regiones de distribución del teocintle, explicando, en parte, los bajos niveles de diferenciación.

En contraste con todo lo anterior, resultan preocupantes los valores tan bajos de variación genética que presentan las poblaciones ubicadas en el municipio de Villa Purificación en Jalisco (Tabla 3, Fig. 10 y 11). Esta situación se ve acompañada además de una alta estructuración entre las poblaciones de la región ( $\theta = 0.2859$ ) (Figs. 19a y 21), influyendo de manera importante en el nivel de estructura genética para la subespecie *parviglumis* (0.2145) y para el conjunto total de poblaciones ( $\theta = 0.1837$ ,

0.1591-0.2096)\*. Muchas poblaciones en el municipio de Villa Purificación han sido identificadas como pequeñas y de estrecha distribución, tal que algunas “existen sólo como pequeños manchones” aislados de otras poblaciones (Godínez-Herrera *et al.*, 2009). La reducción en el tamaño efectivo de las poblaciones puede explicar la baja diversidad, debido a que el efecto de la deriva génica y endogamia es mayor y la fijación de alelos ocurre de manera más rápida disminuyendo el nivel de heterocigosis en las poblaciones (Hedrick, 2005). En el presente estudio, una de estas poblaciones (Villa Purificación PAR6) presentó además el menor tamaño muestral de todas ( $n=20$ ) a pesar de haberse colectado el total de individuos de la población. Las poblaciones de esta región pueden estar en serio peligro de desaparecer a menos que se realicen esfuerzos para su conservación *in situ* o incluso *ex situ* (si se considera que parte de la importancia del teocintle recae en su utilidad dentro de programas de mejoramiento para el maíz domesticado).

El patrón general analizado hasta ahora, donde poblaciones de Jalisco presentan poca variación y aquellas de Michoacán y Guerrero presentan los valores más altos, también se han reportado (con ligeras variantes) en estudios anteriores con isoenzimas (Doebley *et al.*, 1984; Rincón-Enríquez *et al.*, 2005; Sánchez, 2011), microsatélites (Fukunaga *et al.*, 2005; Godínez-Herrera *et al.*, 2009), SNPs (Pyhäjärvi *et al.*, 2013) y secuencias nucleares y de cloroplasto (Moeller *et al.*, 2007). En general, los patrones complejos de flujo génico (Moeller *et al.*, 2007; Fukunaga *et al.*, 2005), que favorecen la mezcla de genotipos provocando un aumento de la diversidad genética en las poblaciones, pueden explicar la falta de diferenciación o la evidencia de introgresión entre ellas. Por otro lado, la fragmentación, el aislamiento y la reducción acelerada del tamaño efectivo que han demostrado efectos tan severos en los niveles de diversidad, son argumentos para explicar la alta diferenciación entre poblaciones de Jalisco (Moeller *et al.* 2007; Sánchez, 2011), sobretodo a la luz de evidencia que señala un efecto de cuello de botella en poblaciones de esa región (Buckler *et al.*, 2006; Godínez-Herrera *et al.*, 2009; Wilkes, 2007) debido, entre otras razones, al cambio de uso de suelo, al cambio de cultivos (principalmente dejando de cultivar razas nativas de maíz) y a la urbanización.

---

\* Debe considerarse altos [basado en el criterio de Wright (1978), donde valores de 0.15 a 0.25 señalan alta diferenciación] o muy altos si se consideran los valores de estructura obtenidos mediante el programa Hickory v.1.1 (Tabla 4) (que no suponen equilibrio Hardy-Weinberg en las poblaciones).

### **Agrupación de las poblaciones de teocintle**

Los resultados obtenidos mediante diferentes métodos de agrupamiento (ACP, STRUCTURE y UPGMA), la baja estructura genética entre grupos ( $\theta=0.0074$ ;  $\theta=0.007$  entre subespecies y razas, respectivamente) y el bajo porcentaje de variación asignado a diferencias entre grupos mediante la prueba AMOVA (Fig. 12) indican que las poblaciones analizadas en este estudio no se agrupan taxonómicamente, es decir, en las dos subespecies (y cuatro razas) propuestas por la literatura. En vez de ello se presentan patrones más complejos. El patrón más claro y con mayor sentido biológico indica la formación de grupos “regionales”, que mientras en algunos casos coinciden con las razas propuestas, en otros (principalmente en las zonas de traslape de las distribuciones) se componen de poblaciones pertenecientes a grupos taxonómicos distintos (Figs. 16, 19b y 20).

La baja diferenciación entre las subespecies y razas puede reflejar el contacto (en cierto grado) que mantienen y/o han mantenido estos grupos a pesar de las diferencias históricas y actuales en su distribución. Sin embargo, según estudios, este contacto está limitado a algunas zonas de solapamiento (Matsuoka, 2002; Ross-Ibarra *et al.*, 2009; Sánchez, 2011; Van Heerwaarden *et al.*, 2011; Pyhäjärvi *et al.*, 2013), dispersión a larga distancia entre regiones (Moeller *et al.*, 2007; Fukunaga *et al.*, 2005) o, indirectamente, a través del maíz domesticado (como intermediario), como lo sugieren Ross-Ibarra *et al.* (2009).

Por un lado, el este del Balsas como región de solapamiento parece tener un potencial de intercambio genético entre ambas subespecies (Hufford *et al.*, 2012), presentándose en los individuos de la región claras señales de mezcla genética (Matsuoka, 2002; Sánchez, 2011; Van Heerwaarden *et al.*, 2011; Pyhäjärvi *et al.*, 2013). En el presente estudio dos de las poblaciones (PAR4 Huilotepec y MEX1 Villa seca) pertenecientes a diferentes subespecies se encuentran ubicadas en esta zona, lo cual teóricamente podría influir en la baja diferenciación entre estos grupos taxonómicos. Sin embargo, al omitir estas poblaciones en el análisis, se obtuvieron resultados similares, con lo cual esta hipótesis pierde soporte. Aún así, debe considerarse que esta región de solapamiento ha existido históricamente (Hufford *et al.*, 2012), por lo que es posible que la información genética transmitida entre subespecies en el pasado haya tenido tiempo para incorporarse a regiones y poblaciones más lejanas a través de flujo génico.. También es importante señalar que esta zona de solapamiento es la única identificada entre las subespecies y que las distribuciones geográficas de estas taxa han

ido cambiando históricamente en función de los cambios climáticos (Hufford *et al.*, 2012); de manera que los patrones de flujo pueden haber sido variables a lo largo de estos cambios, favoreciendo o reduciendo las probabilidades de intercambio genético entre los grupos. Si bien hasta ahora se presume la existencia de sólo dos zonas de intercambio entre ambas subespecies (Hufford *et al.*, 2012), también hay evidencia que soporta un modelo de flujo genético continuo desde su divergencia hace unos 60,000 años (Ross-Ibarra *et al.* (2009), lo cual explicaría los bajos niveles de estructura genética entre y dentro de estos taxa.

Por otro lado, el flujo genético a mediana y larga distancia entre regiones, favorecido por el tipo de polinización, podría también disminuir las diferencias genéticas entre grupos taxonómicos. Bajo este argumento Moeller *et al.* (2007) explican un porcentaje considerablemente bajo de variación (<20%) dentro de las razas y entre ellas. Resultados similares obtiene Sánchez (2011) (6.6% dentro y entre razas), pero argumentando que es el tipo de sistema reproductivo (polinización cruzada) (Sánchez, 2011) el que explica la gran variación dentro de las poblaciones con respecto de aquella entre razas.

Aunado a esto, se ha sugerido la posible intervención del maíz domesticado como intermediario entre las subespecies silvestres para intentar explicar la evidencia de introgresión (histórica y actual) entre ellas (Ross-Ibarra *et al.*, 2009; Van Heerwaarden *et al.*, 2011). Es determinante probar esta hipótesis ya que, de ser así, esta interacción podría no solamente contribuir en la baja diferenciación entre las subespecies, sino también en los altos niveles de variación genética en sus poblaciones (considerando la variación genética también alta en el maíz domesticado).

En contraste con lo anteriormente expuesto, existen en la literatura estudios donde las subespecies y razas sí presentan diferencias relevantes y donde las poblaciones sí se agrupan de manera taxonómica (Doebley *et al.*, 1984; Doebley *et al.*, 1987; Matsuoka *et al.*, 2002; Van Heerwaarden *et al.*, 2011; Pyhäjärvi *et al.*, 2013). Como caso particular Sánchez (2011), utilizando isoenzimas, determinó por medio de una prueba AMOVA que una parte considerable de la variación se localizó entre y dentro de las razas de teocintle (24.6% y 18.65% respectivamente) tal que son relevantes las diferencias entre ellas. Se debe señalar, sin embargo, que el mayor porcentaje de la variación se mantenía concentrado dentro de las poblaciones (56.75%) y que el estudio se realizó sobre accesiones, de manera que los porcentajes de variación dentro de las poblaciones pueden no estar bien representados en la muestra, como es

frecuente en ese tipo de estudios (Hijmans *et al.*, 2000). Por otro lado, Pyhäjärvi *et al.* (2013), al analizar poblaciones naturales por medio de SNPs, determinaron una alta estructura tanto entre subespecies (0.33) como dentro de ellas (0.23 y 0.24 para *ssp. parviglumis* y *ssp. mexicana* respectivamente). Cabe resaltar que ellos utilizaron un número considerablemente mayor de poblaciones (n=21), y un número considerablemente mayor de marcadores (SNPs), lo que puede hacer más robusto su análisis, pero no analizaron las mismas poblaciones ni obtuvieron el mismo tipo de información, por lo cual los patrones de estructuración pueden reflejar procesos distintos entre y dentro de las poblaciones.

Un factor que podría explicar la baja diferenciación obtenida aquí podría derivarse del tipo de marcador utilizado. La estimación del parámetro theta ( $\theta$ ) a partir de marcadores dominantes se calcula regularmente bajo el supuesto de que las poblaciones se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg (como lo hace el programa TFPGA v1.3) y ya que este supuesto difícilmente se cumple en poblaciones naturales, los valores obtenidos deben ser tomados con precaución. Considerando esto, el parámetro  $\theta$  fue obtenido de manera alternativa utilizando un método Bayesiano (que no supone equilibrio en las poblaciones) a través del programa Hickory (Holsinger y Lewis, 2003-2007)(Tabla 4). Mediante este método los valores resultaron ser considerablemente más altos ( $\theta = 0.0999$  entre subespecies y  $\theta = 0.1333$  entre razas). Ante esta nueva evidencia, sería posible que nuestros análisis de agrupamiento reflejen más bien relaciones de ancestría o fenómenos de introgresión particulares entre los grupos taxonómicos, que también han sido reportados anteriormente (Fukunaga *et al.*, 2005).

Cabe señalar que, si bien el objetivo de este estudio no es demostrar la existencia de razas y/o subespecies genéticas en *Zea mays* (pues requeriría un diseño metodológico diferente), estos resultados pueden servir como antecedente para futuros estudios que tengan como objetivo delimitar de manera clara los grupos genéticos de teocintle propuestos en la literatura correspondiente, y posiblemente sugerir una mejor clasificación, así como brindar una referencia a futuro.

### **Efecto de la altitud sobre los niveles de variación genética**

Para el total de loci, la asociación positiva entre la altitud y la diversidad genética que se encontró en este estudio (Figs. 13 y 14), aunque resulta interesante, debe tomarse con reservas. Si bien se ha determinado que la altitud puede ser una variable importante para

la diferenciación entre poblaciones de teocintle (Bradburd *et al.*, 2013; Pyhäjärvi *et al.*, 2013), difícilmente se puede establecer una relación de causalidad entre este factor y las diferencias en diversidad genética entre poblaciones.

El patrón obtenido, según señalan Ohsawa y Ide (2008) no es tan común entre los diferentes estudios, pero ciertamente es más frecuente en plantas herbáceas y puede explicarse bajo algunas circunstancias. Las explicaciones propuestas, sin embargo, no parecen ser adecuadas para los resultados obtenidos aquí. La más adecuada de ellas, a criterio propio, se basa en una menor incidencia de actividades de tipo antropogénico conforme aumenta la elevación (Wen y Hsiao, 2001), de tal modo que los niveles de variación no se ven disminuidos por razones como el cambio de uso de suelo o el cambio de cultivos (con efectos demográficos negativos para las poblaciones). Las poblaciones de teocintle encontradas a mayor elevación (*ssp. mexicana*), sin embargo, están en estrecho contacto con los cultivos de maíz y son tratadas como plaga, de tal modo que son afectadas claramente. Esta situación, siguiendo la línea de razonamiento planteada, generaría un patrón contrario al obtenido.

En contraste, y de acuerdo a la mayoría de los estudios revisados por esos autores (Ohsawa y Ide, 2008), cabría esperar que conforme aumenta la elevación los niveles de variación se reduzcan. Según esta idea, a mayor altitud las poblaciones tienden a presentar procesos de fragmentación y aislamiento los cuales pueden disminuir sus niveles de variación genética y generar pérdida de la riqueza alélica por efecto de la deriva génica. Sin embargo, las poblaciones de mayor elevación analizadas aquí son precisamente las que presentan menos evidencia de aislamiento y pérdida de diversidad. Ante esta falta de coherencia, es posible que procesos locales (demográficos) en las poblaciones estén imponiendo un sesgo en el patrón general de variación relacionado con la altitud. En este sentido, las dos poblaciones muestreadas en Villa Purificación (Jalisco) a baja altitud presentan señales de estar sometidas a procesos de aislamiento genético (Tabla 3, Fig. 10, 11, 19a y 21), con todo lo que ello implica, de tal modo que los bajos niveles de variación genética que presentan pueden obedecer a esta razón y no al hecho de que las poblaciones crezcan a baja altitud. De hecho, otra población (PAR1 Tecoaapa), que crece aproximadamente a la misma elevación que las antes mencionadas pero en diferente región (Balsas), es altamente diversa y estudios anteriores han demostrado que habría experimentado aumento en su tamaño efectivo (Moeller *et al.*, 2007).

### **Loci bajo procesos de selección y su relación con la altitud**

A una menor escala (para loci individuales), la altitud parece ser un factor más relevante. De los seis loci identificados como posibles candidatos a estar bajo selección, dos se correlacionaron significativamente con la altitud (Fig. 15), lo que si bien puede indicar la influencia de esta variable sobre solo unos pocos loci, también pone de manifiesto la utilidad de los ISSRs para identificar loci asociados a factores de importancia. Se debe destacar que anteriormente se han identificado algunos loci correlacionados con la altitud en poblaciones de teocintle a través de diferentes marcadores. Ya sea con isoenzimas (Doebley *et al.*, 1987) o SNPs (Pyhäjärvi *et al.*, 2013), la altitud parece tener un rol importante en la adaptación local y en la diferenciación entre poblaciones.

De forma interesante los dos loci mencionados presentaron señales de selección de tipo direccional (y no balanceadora), de modo que algún(os) factor(es) asociado(s) a la altitud (o el conjunto de estos) parecen dirigir la posible fijación de determinados alelos. A manera de antecedente, se ha establecido anteriormente que caracteres adaptativos correlacionados con la altitud parecen estar sometidos a procesos de selección direccional, a través de genes pre-adaptados que pueden fijarse ante cambios en el ambiente por efecto de la altitud (Hahn *et al.*, 2012). En este caso los dos loci mencionados correlacionaron negativamente con la altitud, reduciendo cada uno de ellos la frecuencia del alelo dominante en las poblaciones más elevadas. Bajo este contexto general, un alelo (en este caso el recesivo) que no funciona tan adecuadamente a baja altitud, podría tener un rol importante a mayor altitud. Es importante señalar que los fragmentos amplificados mediante ISSRs pueden conformarse por numerosas secuencias codificantes y no codificantes que pueden o no estar ligadas, por lo que es insuficiente la identificación realizada aquí para realizar análisis más profundos sobre el papel de la altitud en el comportamiento de genes o grupos de genes específicos. Sin embargo, se debe resaltar el hecho de que este tipo de marcador de fácil manipulación y bajo costo resulte tan altamente informativo, ya que puede facilitar considerablemente la metodología para encontrar secuencias específicas asociadas a la variable estudiada, en este caso, la altitud.



## Conclusiones

- 1) Se presentan, en general, altos niveles de diversidad dentro de subespecies, razas, y poblaciones de teocintle, potenciados presumiblemente por un sistema reproductivo de entrecruza, una amplia distribución, un recurrente flujo genético entre poblaciones y un genoma complejo.
- 2) Las poblaciones del sur de Jalisco presentan señales de aislamiento genético, con muy baja diversidad y alta diferenciación entre poblaciones cercanas, debido aparentemente a la reducción de su tamaño efectivo por actividades antropogénicas, por lo que se recomienda su protección *in situ* y/o *ex situ*.
- 4) La variación genética se concentra en su mayoría dentro de las poblaciones y estas se agrupan regionalmente (en su mayoría), independientemente de su clasificación taxonómica y ajustándose a un modelo de aislamiento por distancia.
- 5) Se recomienda aumentar el número de marcadores y de poblaciones, así como realizar muestreos específicos en búsqueda de patrones de estructura más claros, sobretodo en torno a variables ambientales que expliquen la distribución de la variación encontrada.

## Literatura citada

- Almeida, C., E. Perito-Amorim, J. F. Barbosa-Neto, J. A. Cardoso-Filho y M. J. Cruz de Melo-Sereno.** 2011. Genetic variability in populations of sweet corn, common corn and teosinte, *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, **11**: 64-69
- Amaral-Junior, A. T. , E. C. Oliveira, L. S. Azeredo-Goncalves, C. A. Scapim, L. S. Candido, T. Rodrigues da Conceicao-silva, C. Vittorazzi y K, Silva da Cunha.** 2011. Assessment of genetic diversity among maize accessions using inter simple sequence repeats (ISSR) markers, *African Journal of Biotechnology*, (**10**): 15462-15469
- Baltazar B. M. y J. B. Schoper.** 2002. Crop-to-crop gene flow: dispersal of transgenes in maize, during field tests and commercialization. In: Proc 7th Int Symp Biosafety Genet Modified Organisms. Beijing, China.
- Baltazar M., J. Sánchez-González, L. de la Cruz-Larios y J. B. Schoper.** 2005. Pollination between maize and teosinte: an important determinant of gene flow in México, *Theor Appl Genet*, **110**: 519–526
- Bardakci F.** 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers, *Turk J Biol*, **25**:185-196
- Basik, M., D. L. Stoler, K. C. Kontzoglou, M. A. RodriguezBigas, N. J. Petrelli, y G. R. Anderson.** 1997. Genomic instability in sporadic colorectal cancer quantitated by inter-simple sequence repeat PCR analysis, *Genes Chromosomes & Cancer* **18**:19-29
- Benz, B. F.** 2001. Archaeological evidence of teosinte domestication from Guila´ Naquitz, Oaxaca, *PNAS*, **98**: 2104-2106
- Blair, M. W., O. Panaud, y S. R. McCouch.** 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, **98**:780-792.
- Bornet, B y M. Branchard.** 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting, *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209–215
- Bornet B., E. Antoine, M. Bardouil y C. Marcaillou-Le Baut .** 2004. ISSR as new markers for genetic characterization and evaluation of relationships among phytoplankton, *Journal of Applied Phycology*, **16 (4)**: 285 - 290
- Bradburd, G., P. Ralph y G. Coop.** 2013. Disentangling the effects of geographic and ecological isolation on genetic differentiation, *Evolution*, **67**: 3258-73
- Buckler IV, E. S. y M. N. Stevens.** 2006. Maize origins, domestication, and selection. In Darwin’s harvest: new approaches to the origins, evolution and conservation of crops (eds T. J. Motley, N. Zerega & H. Cross), pp. 67– 90. New York, NY: Columbia University Press.

- Buckler, E. S., M. M. Goodman, T. P. Holtsford, J. F. Doebley y J. Sanchez G.** 2006. Phylogeography of the wild subspecies of *Zea mays*. *Maydica* 51: 123–134.
- Carvalho, V. P., P. M. Ruas, C. F. Ruas, J. M. Ferreira y R. M. P. Moreira.** 2002. Assessment of genetic diversity in maize (*Zea mays* L.) landraces using inter simple sequence repeats (ISSR) markers, *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, (2): 567-568.
- Casas, J., J. Ramírez, J. Sánchez, J. Parra, S. Hernández y M. Chuel.** 2003. Características agronómicas en retrocruzamientos maíz-teocintle, *Revista fitotecnia mexicana* 26,:239-248.
- Cavan, G., V. Potier, y S. R. Moss.** 2000. Genetic diversity of weeds growing in continuous wheat, *Weed Res*, 40:301-310.
- Collins G. N. , A. E . Longley.** 1935 A tetraploid hybrid of maize and perennial teosinte. *Journal of Agricultural Research* 50: 123-133.
- Culley, T. M., y A. D. Wolfe.** 2001. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR markers. *Heredity*, 86: 545–556
- Doebley J. F. y H. H. Iltis.** 1980 Taxonomy of *Zea* (Gramineae). I. A subgeneric classification with key to taxa, *Am. J. Bot.* 67: 982-993.
- Doebley J. F., M. M. Goodman, C. W. Stuber.** 1984 Isoenzymatic variation in *Zea* (Gramineae). *Syst. Bot.* 9: 203-218.
- Doebley, J. M. Goodman y C. Stuber.** 1987. Patterns of Isozyme Variation between. Maize and Mexican Annual Teosinte, *Economic Botany*, 41(2): 234-246
- Doebley, J.** 1990. Molecular evidence and the evolution of maize. *Econ. Bot.* 44 (3): 6-27.
- Doebley J. F., A. Stec, J. Wendel y M. Edwards.** 1990. Genetic and morphological analysis of a maize-teosinte F<sub>2</sub> population: implications for the origin of maize, *PNAS* 87: 9888-9892
- Doebley J., A. Stec y C. Gustus.** 1995. *teosinte branched1* and the origin of maize: evidence for epistasis and the evolution of dominance, *Genetics* 141: 333-346
- Doyle, J. J. y J. L. Doyle.** 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- Eguiarte, L. E., V. Souza y X. Aguirre (comp.).** 2007. Ecología Molecular. México.
- Ellstrand, N. C., L. C. Garner, S. Hegde, R. Guadagnuolo y L. Blancas.** 2007. Spontaneous hybridization between maize and teosinte. *Journal of Heredity*, 98: 183-187.

- Evanno S., G. Regnaut y J. Goudet.** 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**: 2611-2620
- Excoffier, L.** *Arlequin* ver 3.11. 1998-2007. CMPG: University of Berne
- Foll M. y O. Gaggiotti.** 2008. A Genome-Scan Method to Identify Selected Loci Appropriate for Both Dominant and Codominant Markers: A Bayesian Perspective, *genetics*.180: 977-993.
- Fukunaga, K., J. Hill, Y. Vigouroux, Y. Matsuoka, J. Sánchez, K. Liu, E. S. Buckler y J. Doebley.** 2005. Genetic diversity and population structure of teosinte. *Genetics*, **169**: 2241-2254.
- Gepts, P.** 2004. Crop domestication as a long-term selection experiment. En: Janick J. Ed. *Plant Breeding Reviews*, Volume 24, part 2. John Wiley & Sons, Inc.
- Girma, G., K. Tesfaye y E. Bekele.** 2010. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) analysis of wild and cultivated rice species from Ethiopia, *African Journal of Biotechnology*, 9(32): 5048-5059
- Godínez Herrera, J. de J., J. de J. Sánchez-González, J. Ron-Parra y F. Santacruz-Ruvalcaba.** 2009. Estimación de reducciones en tamaño efectivo de población en teocintle del Occidente de México, *Scientia-Cucba*, **11**: 11-21.
- Godwin, D., E. A. B. Aitken y L. W. Smith.** 1997 Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics, *Electrophoresis*, **18**: 1524-1528
- González, A., y X. Aguirre.** 2007. Inter simple sequence repeats (ISSRs) en: **Eguiarte, L. E., V. Souza y X. Aguirre** (comp.). 2007. *Ecología Molecular*. México.
- González Fortes, G. M.** 2008. Desarrollo de un mapa genético con marcadores AFLP y microsatélite en rodaballo ("Scophthalmus maximus L."). Tesis de Doctorado. Universidad de Santiago de Compostela. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico.
- Goslee, S. C. y D. L. Urban.** 2007. The Ecodist package for dissimilarity-based analysis of ecological data. *Journal of Statistical Software* **22** : 1-19
- Guasmi, F.,W. Elfalleh, H. Hannachi, K. F`eres, L. Touil, N. Marzougui, T. Triki, y A. Ferchichi.** 2012. The Use of ISSR and RAPDMarkers for Genetic Diversity among South Tunisian Barley, *ISRN Agronomy*: 1-10
- Gupta M., Y-S. Chyi, J. Romero-Severson y J. L. Owen** .1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* **89**: 998-1006.
- Hahn, T., C. J. Kettle, J. Ghazoul, E. R. Frei, P. Matter, A. R. Pluess.** 2012. Patterns of Genetic Variation across Altitude in Three Plant Species of Semi-Dry Grasslands, *PLoS ONE*, **7**: 1-10

**Hamilton, N. R. S., J. M.M. Engels, Th. J. L. Van Hintum, B. Koo y M. Smale.** 2002. Accession Management: combining or splitting accessions as a tool to improve germplasm management efficiency, Technical Bulletin No. 5, IPGRI, Roma Italia.

**Hamrick J. L. Y J. W. Godt.** 1996. Effects of Life History Traits on Genetic Diversity in Plant Species, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* (351):1291-1298

**Harshberger, J. W.** 1999. Fertile crosses of teosinte and maize. *Garden and Forest*, 9: 522-523.

**Hartl, D. y A.G. Clark.** 1997. Principles of Population Genetics, Sinauer Associates, Sunderland, MA.

**Hastorf, C.** 2009. Rio Balsas most likely region for maize domestication, *PNAS*, 106 (13): 4957–4958.

**Haudry, A., A. Cenci, C. Ravel, T. Bataillon, D. Brunel, C. Poncet, I. Hochu, S. Poirier, S. Santoni, S. Glemin, y J. David.** 2007. Grinding up wheat: a massive loss of nucleotide diversity since domestication, *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1506–1517

**Hedrick, P. W.** 2005. Genetics of Populations, , Jones and Bartlett publishers, USA, 737

**Hijmans, R. J. K. A. Garret, Z. Huamán, D. P. Zhang, M. Schreuder y M. Bonierbale.** 2000. Assessing the Geographic Representativeness of Genebank Collections: the Case of Bolivian Wild Potatoes, *Conservation Biology*, 14: 1755–1765

**Holsinger K. E. y P. O.Lewis .**2007. *Hickory: A package for analysis of population genetic data, version 1.1. Computer program and documentation, Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA, website: <http://darwin.eeb.uconn.edu/hickory/hickory.html>*

**Hou, Y. , Z Yan, Y. Wei, Y. Zheng** 2005. Genetic diversity in barley from west China based on RAPD and ISSR analysis, *Barley Genetics Newsletter* 35:9-22

**Hubby, J. L. y R. C. Lewontin.** 1966. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*, *Genetics* 54: 577-594

**Hufford, M. B., P. Lubinsky, T. Pyhäjärvi, M. T. Devengenzo, N. C. Ellstrand y J. Ross-Ibarra.** 2013. The genomic signature of crop-wild introgression in maize, *PLoS Genetics* 9: 1-13

**IBM Corp. Released 2010.** IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.

**Idris A. E., N. B. Hamza, S. O. Yagoub, A. I.A. Ibrahim y H. K.A. El-Amin.** 2012. Maize (*Zea mays* L.) Genotypes Diversity Study by Utilization of Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6: 42-47

- Iltis H. H., J. F. Doebley, M. R. Guzmán y B. Pazy**, 1979. *Zea diploperennis* (Gramineae): A new teosinte from Mexico, *Science* **203**: 186-188.
- Iltis H. y J. Doebley**. 1980. Taxonomy of *Zea* (Gramineae). II. Subspecific categories in the *Zea mays* complex and a generic synopsis. *Am. J. Bot.* **67**: 994-1004
- Iltis, H. y B. F. Benz**. 2000. *Zea nicaraguensis* (Poaceae), a new teosinte from Pacific coastal Nicaragua. *Novon* 10: 382-390
- Jeffreys, H.** 1961. Theory of probability. Oxford University Press. Oxford.
- Jones C. J., K. J. Edwards, S. Castaglione, M.O. Winfield, F. Sala, C. van deWiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, A. Malcevschi, N. Marmiroli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, R. Linacero, A. Vázquez y A. Karp**. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories, *Molecular Breeding* **3**: 381–390
- Kantety, R. V., X. Zeng, J. L. Bennetzen y B. E. Zehr**. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Molecular breeding* (**1**): 365-373.
- Kato-Yamakake, T. A.** 1975. Cytological studies of maize and teosinte and relation to their origin and evolution. Ph. D. Dissertation. University of Massachusetts. Amherst.
- Kermicle J. L. y J. O. Allen**. 1990. Cross-incompatibility between maize and teosinte. *Maydica* **35**: 399-408.
- Kojima, T., T. Nagaoka, K. Noda, y Y. Ogihara**. 1998. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* **96**:37-45.
- Kostia, S., M. Ruohonen-Lehto, R. Väinölä y S.L. Varvio**. 2000. Phylogenetic information in inter-SINE and inter-SSR fingerprints of the Artiodactyla an evolution of the Bov-tA SINE, *Heredity*, 84: 32-45.
- Kumar S. K., L. Kusuma, N.B. Ramachandra y N. Vijay M.** 2012. Genetic variations among Ecologically diverse species of Anurans at the level of Genus based on ISSR Marker, *I. Res. J. Biological Sci.*, **1(7)**:11-19
- Lauter N., C. Gustus, A. Westerbergh y J. Doebley**. 2004. The Inheritance and Evolution of Leaf Pigmentation and Pubescence in Teosinte, *Genetics* 167: 1949–1959
- Lewontin, R. C., y J. L. Hubby**. 1966. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*, *Genetics* **54**: 595-609.

- Li, X. R., L. Tan, Z. Zhu, H. Huang, Y. Liu, S. Hu, y C. Sun.** 2009. Patterns of nucleotide diversity in wild and cultivated rice. *Plant Syst. Evol.* **281**: 96–106.
- Lumholtz, C.** 1902. Unknown Mexico, Vol I. C. Scribners'Sons, N.Y, USA.
- Lynch, M y B. G. Milligan.** 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers, *Molecular Ecology* **3**: 91-99.
- Machkour-M'Rabet, S., Y. Henaut, A. Dor, G. Perez-Lachaud, C. Pelissier, Ger.** 2009. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as molecular markers to study genetic diversity in tarantulas (Araneae, Mygalomorphae). *The Free Library* (January, 1), [http://www.thefreelibrary.com/ISSR \(Inter Simple Sequence Repeats\) as molecular markers to study...-a0235406999](http://www.thefreelibrary.com/ISSR+(Inter+Simple+Sequence+Repeats)+as+molecular+markers+to+study...-a0235406999) (accessed September 04 2013)
- Magnusson A.** 2012. gmt:interface between GMT map-making software and R. R package version 1.1-9. <http://CRAN.R-project.org/package=gmt>.
- Mantel, N.** 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach, *Cancer research* **27**: 209-220.
- Matsuoka, Y., Y. Vigouroux, M. M. Goodman, J. Sánchez, E. S. Buckler y J. Doebley.** 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**: 6080–6084.
- Matsuoka Y.** 2005. Origin matters: Lessons from the search for the wild ancestor of maize. *Breeding Sci*, **55**: 383-390
- Miller, M. P.** 1997. Tools for population genetic analyses [TFPGA] 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
- Moeller D. A., M. I. Tenailon y P. Tiffin.** 2007. Population structure and its effects on patterns of nucleotide polymorphism in teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*). *Genetics* **176**: 1799-1809
- Mondragon-Pichardo J y H. Vibrans.** 2005. Ethnobotany of the Balsas teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*). *Maydica* **50**: 123-128.
- Nagaoka, T., y Y. Ogihara.** 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, **94**:597-602.
- Nei, M.** 1972. Genetic distance between populations, *Amer. Naturalist*, **106**:283-92.
- Nybom, H.** 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants, *Molecular Ecology* ,**13**: 1143–1155
- Ohsawa, T. y Y. Ide.** 2008. Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains, *Global Ecology and Biogeography*, **17**: 152–163

**Oliveira, A. C., T. Richter, y J. L. Bennetzen.** 1996. Regional and racial specificities in sorghum germplasm assessed with DNA markers. *Genome* **39**:579-587.

**Pernés, J.** 1983. La genética de la domesticación de los cereales, *Mundo Científico*, 3: 964-974

**Piperno, D. R., A. J. Ranereb, I. Holstb, J. Iriarted y R. Dickauc.** 2009. Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico, *PNAS*, **106**: 5019–5024  
ESEARCHREVIEW

**Pradeep, R. M., N. Sarla y E. A. Siddiq.** 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding, *Euphytica* **128**: 9–17.

**Pritchard J. K., M. Stephens y P. Donnelly.** 2000. Inference of population structure from multilocus genotype data. *Genetics*, **155**:945-959

**Pyhäjärvi, T., M. B. Hufford, S. Mezmouk y J. Ross-Ibarra.** 2013. Complex Patterns of Local Adaptation in Teosinte, *Genome Biol. Evol*, **9**: 1594-1609.

**R Core Team.** 2012. R: language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, vienna, Austria. ISBN3-900051-07-0,URL <http://www.R-project.org>

**Ranere A. J., D. R. Piperno, I. Holst, R. Dickau y J. Iriarte.** 2008. The cultural and chronological context of early Holocene maize and squash domestication in the Central Balsas River Valley, Mexico., *Proc Natl Acad Sci*, **106**(13):5014-2018.

**Raymond, M. L. y F. Rousset.** 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution*, **49**: 1280-1283.

**Rincón-Enríquez G., P. R. Vallejo, J. D. Sánchez González, y T. A. Kato Yamakake.** 2005. Isozymatic variation of teosinte populations, *Rev Fitotec Mex* **28**: 105-113.

**Rogers J. S.** 1950a. The inheritance of inflorescence characters in maize-teosinte hybrids. *Genetics* **35**: 541-558.

**Rogers J. S.** 1950b. The inheritance of photoperiodic response and tillering in maize-teosinte hybrids. *Genetics* **35**: 513-540

**Rogers, J. S.** 1950c. Fertility relationships in maize-teosinte hybrids. Texas agricultural experiment station, boletín 730: 1-18.

**Ross-Ibarra J., P. L. Morrell y B. S. Gaut.** 2007. Plant domestication, a unique opportunity to identify the genetic basis of adaptation, *PNAS*, **104**: 8641–8648

**Ross-Ibarra, J., M. Tenailon y B. S. Gaut.** 2009. Historical Divergence and Gene Flow in the Genus *Zea*, *Genetics*, **181**: 1399–1413.



**Sánchez, J.J., y A. Ruiz-Corral.** 1996. Distribución del teocintle en México. p 20-38 En: Serratos, J.A., M.C. Willcox y F. Castillo. Flujo genético entre maíz criollo, maíz mejorado y teocintle: implicaciones para el maíz transgénico. México, D.F. CIMMYT.

**Sánchez, 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. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. Guadalajara, Jalisco, México.

**Sánchez J. J. L. De La Cruz, V. A. Vidal, J. Ron, F. Santacruz-Ruvalcaba, S. Sood, J. B. Holland, J. A. Ruíz, S. Carvajal, F. Aragón, V. H. Chávez, M. M. Morales y R. Barba-González.** 2011. Three new teosintes (*Zea* spp., Poaceae) from México, *Am. J. Bot.*, **98**: 1537-1548

**Sánchez, J. J.** 2011. Diversidad del Maíz y el Teocintle. Informe preparado para el proyecto: "Recopilación, generación, actualización y análisis de información 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 de la Hoz, M. P., J. A. Dávila, Y. Loarce, y E. Ferrer.** 1996. Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley. *Genome* **39**:112-117.

**Sawyer, N. A., S. M. Chambers y J. W. G. Cairney.** 2003. Distribution of *Amanita* spp. genotypes under eastern australian sclerophyll vegetation. *Mycol. Res.* **107**, 1157–1162.

**Schnable, P. S., D. Ware, R. S. Fulton, J. C. Stein, F. Wei, S. Pasternak, C. Liang, J. Zhang, L. Fulton y T. A. Graves et al.** 2009. The B73 Maize genome: complexity, diversity and dynamics, *Science*, **326**: 1112-1115.

**Serratos-Hernandez, J. A.** 2009. the origin and diversity of Maize in the American continent. Greenpeace, México

**Shannon C. E. y W. Weaver.** 1949. The mathematical theory of communication. Univ. of Illinois Press, Urbana.

**Smith J. S. C., M. M. Goodman y R. N. Lester,** 1981. Variation within teosinte. I. Numerical analysis of morphological data, *Econ Bot* **35**: 187-203.

**Sonah H., R. K. Deshmukh, A. Sharma, V. P. Singh y D. K. Gupta, R. N. Gacche, J. C. Rana, N. K. Singh, T. R. Sharma.** 2011. Genome-Wide Distribution and Organization of Microsatellites in Plants: An Insight into Marker Development in *Brachypodium*. *PLoS ONE* **6**: 1-9

**Stephen J., C. Smith y R. N. Lester.** 1980. Biochemical Systematics and Evolution of *Zea*, *Tripsacum* and Related Genera, *Economic Botany*, **34** (3): 201-218

**Stolpovskii, Y. A., O. E. Lazebny, K. Y. Stolpovskii y G. E. Sulimova.** 2010. The use of the ISSR-PCR method for identifying domesticated animal breeds and Species, Inferring their population structures and assessing gene pool similarity, *Animal genetics*, **6**:732-739.

**Terra T. de F., P., Wiethölter, C. C. de S. Almeida, D. dos A. Silva, F. Bered, M. J. C. de M. Sereno y J. F. Barbosa Neto.** 2011. Genetic variability in maize and teosinte populations estimated by microsatellites markers, *Ciência Rural, Santa Maria*, **41** (2): 205-211.

**Tiarovska, J., S. Senková, M. Beto, K. Ratná, M. Masnica y M. Labajová.** 2013. ISSR markers as a tool to distinguish Idt and SSS populations of *Zea mays* L. *Journal of Central European Agriculture*, **14**(2):11-21.

**Timothy D. H., C. S. Levings, D. R. Pring, M. F. Conde y J. L. Kermicle.** 1979. Organelle DNA variation and systematic relationships in the genus *Zea*: Teosinte, *PNAS*, **76**: 4220-4224.

**Van Heerwaarden J., J. Ross-Ibarra, J. Doebley, J. C. Glaubitz, J. de J. González, B. S. Gaut y L. E. Eguiarte.** 2010. Fine scale genetic structure in the wild ancestor of maize (*Zea mays* ssp. *parviglumis*). *Molecular Ecol*, **19**(6):1162-73.

**Van Heerwaarden, J., J. Doebley, W. H. Briggsc, J. C. Glaubitzd, M. M. Goodman, J. Sánchez Gonzalez y J. Ross-Ibarra.** 2011. Genetic signals of origin, spread, and introgression in a large sample of maize landraces, *PNAS*, **108** (3): 1088-1092.

**Van Liet, V., N. T. T. Linh, N. T. Thuy, V. T. B. Hanh, P. Q. Tuan, N. T. Phuong Thao.** 2011. Genetic diversity of maize (*Zea mays* L.) accessions using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Journal of Southern Agriculture* **42**: 1029-1034

**Varshney R. K., A. Graner y M. E. Sorrells.** 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications, *TRENDS in Biotechnology*, **23**; 48-55

**Vázquez Lobo A., 1996.** Filogenia de Hongos Endófitos del género *Pinus* L.: Implementacion de Técnicas moleculares y Resultados Preliminares, Tesis de Licenciatura, Fac. Ciencias, UNAM, México, 66.

**Virk, P. S., J. Zhu, H. J. Newbury, G. J. Bryan, M. T. Jackson y B. V. Ford-Lloyd.** 2000. Effectiveness of different classes of molecular marker for classifying and revealing variation in rice (*Oryza sativa*) germplasm, *Euphytica* **112**: 275-284.

**Vis, M. L.** 1999. Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular markers to distinguish gametophytes of *Batrachospermum boryanum* (batrachospermales, Rhodophyta, *Phycol* **38**:70-73.

**Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper y M. Zabeau.** 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Research*, **23**: 4407-4414

**Warburton, M., G. Wilkes, S. Taba, A. Charcosset, C. Mir, F. Dumas, D. Madur, S. Dreisigacker, C. Bedoya y B. M. Prasanna.** 2011. Gene flow among different teosinte taxa and into the domesticated maize gene pool, *Genetic Resources and Crop Evolution*, **58** (8): 1243-1261

**Weir B. S. y C. C. Cockerham.** 1984. Stimating F-Statistics for the analysis of population structure, *Evolution*, 38: 1358-1370.

**Wen, C. S. y J. Y. Hsiao.** 2001. Altitudinal genetic differentiation and diversity of Taiwan lily (*Lilium longiflorum* var. *formosanum*; Liliaceae) using RAPD markers and morphological characters. *International Journal of Plant Sciences*, **162**: 287–295.

**Wessler, S. R.** 2006. Eukaryotic Transposable Elements: Teaching Old Genomes New Tricks. In *The Implicit Genome*. Caporale, LH. Editor, Oxford University Press.

**Wilkes, H. G.** 1967. Teosinte: the closest relative of maize. The Bussey Inst., Harvard Univ., Cambridge.

**Wilkes, H. G.** 1997. Teosinte in Mexico: Personal Retrospective and Assesment. In Serratos J. A., M. C. Wilcox y F. Castillo-Gonzalez ( Eds.), *Gene flow among maize landraces, Improved Maize Varieties, and Teosinte: implications for transgenic maize*. México, D. F. : CIMMYT: 10-17.

**Wilkes, G.** 2007. Urgent notice to all maize researchers: disappearance and extinction of the last wild teosinte population is more than half completed, a modest proposal, for teosinte evolution and conservation in site: The Balsas, Guerrero, Mexico. *Maydica* **52**: 49–58.

**Wolfe A. D., Q-Y. Xiang y S. R. Kephart.** 1998a. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence repeat markers. *Molecular Ecology* **7**: 1107-1125.

**Wolfe A. D., Q-Y. Xiang y S. R. Kephart.** 1998b Diploid hybrid speciation in *Penstemon* (Scrophulariaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **95**: 5112-5115.

**Wright, S.** 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics*, **15**: 323-354.

**Wright, S.** 1978. *Evolution and the Genetics of Populations*. Vol. 4. Variability Within and Among Natural Populations. Univ. of Chicago Press, Chicago.

**Yang, W., A. C. Oliveira, I. Godwin, K. Schertz, y J. L. Bennetzen.** 1996. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. *Crop Sci* **36**: 1669-1676.

**Yeh, F. C., R. C. Yang, T. Boyle, Z. H. Ye y J. X. Mao.** 1997. POPGENE: the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada. [Available at <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>]

**Zietkiewicz E., A. Rafalski y D. Labuda** .1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* **20**: 176-183.

**Zhou, Z. H., M. Miwa, y T. Hogetsu.** 1999. Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix kaemferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). *New Phytol* ,**144**:55-63

## APÉNDICE I

### Método “mini-prep” de extracción de ADN (Vázquez Lobo, 1996)

1. Moler aproximadamente un gramo de tejido con nitrógeno líquido \*(agregando un poco de microperlas de vidrio)
2. Agregar al mortero 1000 µl de CTAB2X y homogeneizar
3. Recuperar todo en un tubo eppendorf de 1.5ml
4. Centrifugar a 10,000 g por 8 minutos a 4°C
5. Eliminar el sobrenadante
6. Resuspender con 600 ul CTAB2X \*(Agregar 60ul de proteinasa K)\*
7. Incubar a 65° por 15 min.
8. Agregar 600 ul de cloroformo:octanol 24:1 y agitar hasta homogenizar \*(cloroformo:fenol:octanol 24:2:1)\*
9. Centrifugar a 7000g por 12 min. a 4°C o hasta que el sobrenadante quede transparente
10. Recuperar 200ul de sobrenadante en un tubo nuevo
11. Agregar 2/3 de volumen (600ul) de Isopropanol frío a -20°C
12. Reposar por 2 a 12 horas a -20°C
13. Centrifugar a 9000 g por 5 min. a 4°C
14. Eliminar el sobrenadante
15. Agregar 1000 ul de etanol al 70% frío a -20°C
16. Reposar por 5 min. a temperatura ambiente.
17. Centrifugar a 7000 g por 5 min.
18. Eliminar el sobrenadante
19. Dejar secar
20. Resuspender en agua destilada.

## APÉNDICE II

### Protocolo de extracción para las dos subespecies (*Zea mays ssp. mexicana* y *Zea mays ssp. parviglumis*)

1. Cortar fragmentos de tejido fresco (de preferencia) o congelado de aprox. 1g en el mortero y agregar nitrógeno líquido. Moler hasta obtener un polvo fino. No moler en exceso para evitar fraccionamiento del DNA.
2. Agregar 600 µl de buffer de extracción CTAB 2X y recuperar en un microtubo de 2.0ml.
- 3.-Centrifugar a 10 000 rpm durante 8 minutos y eliminar el sobrenadante.
4. Resuspender con 600 µl de CTAB 2X.
5. Incubar a 65°C por 20 minutos (agitar cada 5 minutos). Conservar en hielo de 10-15 minutos.
6. Agregar 600 µl de cloroformo:octanol 24:1 a cada tubo, agitar en vórtex hasta homogeneizar. Centrifugar a 10 000 rpm durante 12 min.
7. Trasladar sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 ml. Para obtener ADN limpio debe evitarse recuperar material turbio de la difase formada, es decir, material no transparente. Para ello recuperar únicamente el 70% del sobrenadante, aproximadamente 600 µl (utilizar pipeta de 200 µl).
8. Precipitar el ADN con isopropanol frío a -20°C. Para ello agregar 2/3 del volumen obtenido en el paso anterior. Dejar reposar 2 horas o más a -20°C, procurando no excederse en el tiempo pues el ADN obtenido puede quedar sucio.
9. Centrifugar a 13 000 rpm durante 13 min. Eliminar sobrenadante. Se formará un pellet semitransparente al fondo del tubo. Si el color del pellet es intenso y/o muy grande es posible un mal resultado de la extracción.
10. Limpiar el ADN agregando 1ml de etanol al 70% a -20°C, mezclar en vórtex y centrifugar a 8 000 rpm durante 8 min. Eliminar sobrenadante sin perder el pellet.
11. Rehidratar con agua ultra pura el ADN, el volumen dependerá del tamaño del pellet desde 15 µl hasta 150 µl aproximadamente.

## APÉNDICE III

### Programa de amplificación para los cinco iniciadores

810	811	827	841	809
95° 4min  <u>      x 35      </u>	95° 4min  <u>      X 35      </u>	95° 4min  <u>      X 35      </u>	95° 4min  <u>      X 35      </u>	95° 4min  <u>      X 35      </u>
94° 40seg	94° 40seg	94° 40seg	94° 40seg	94° 40seg
<b>58°</b> 50seg	<b>56.8°</b> 50seg	<b>58°</b> 50seg	<b>55.5°</b> 50seg	<b>60°</b> 50seg
72° 2min	72° 2min	72° 2min	72° 2min	72° 2min
72° 5min	72° 5min	72° 5min	72° 5min	72° 5min
4° -----	4° -----	4° -----	4° -----	4° -----

### Concentración de reactivos para cada marcador

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final					Reacción de 30 µl				
		810	811	827	841	809	810	811	827	841	809
Buffer	10X	1X					3µl				
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	3.3mM	4.67mM	4.17mM	<b>4.67mM</b>	4.17mM	2 µl	2.8 µl	2.5 µl	2.8 µl	2.5µl
dNTPmix	2.5 mM c/u	0.2mM					2.4 µl				
Primer	10µM	0.63µM					1.9 µl				
DNA	50 ng/µl	70ng/ µl					2.0 µl				
Taq	5 U/µl	1 U/ µl					0.2 µl				
H <sub>2</sub> O							18.5µl	17.7 µl	18 µl	17.7µl	18 µl

## APÉNDICE IV.

Frecuencias alélicas totales y prueba de diferenciación de Raymond y Rousset (1995) para cada locus. Se presenta el resultado para la comparación entre todas las poblaciones, entre subespecies, y dentro de cada subespecie.

Locus	Todas las poblaciones		Todas las poblaciones		ssp parviglumis X ssp. mexicana		Zea mays ssp. parviglumis		Zea mays ssp. mexicana	
	p	q	R&R	S.E.	R&R	S.E.	R&R	S.E.	R&R	S.E.
841-1	0.1960	0.8040	0.0000	0.0000	0.1648	0.0122	0.0000	0.0000	0.5486	0.0054
841-2	0.5504	0.4496	0.0004	0.0003	0.6158	0.0091	0.0163	0.0035	0.0020	0.0004
841-3	0.2554	0.7446	0.0000	0.0000	0.1051	0.0136	0.0000	0.0000	0.3146	0.0118
841-4	0.0683	0.9317	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0016	0.0004
841-5	0.1439	0.8561	0.0000	0.0000	0.5344	0.0134	0.0000	0.0000	0.6481	0.0099
841-6	0.9299	0.0701	0.8930	0.0080	1.0000	0.0000	0.8501	0.0106	1.0000	0.0000
841-7	0.1079	0.8921	0.0000	0.0000	0.6261	0.0112	0.0003	0.0002	0.0013	0.0008
841-8	0.3004	0.6996	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0050	0.0018
841-9	0.1817	0.8183	0.0000	0.0000	0.0040	0.0014	0.0000	0.0000	0.8359	0.0068
841-10	0.2410	0.7590	0.0000	0.0000	0.8930	0.0030	0.0000	0.0000	0.3910	0.0160
841-11	0.1601	0.8399	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0160	0.0030
841-12	0.3291	0.6709	0.0048	0.0027	0.4421	0.0160	0.1550	0.0140	0.0000	0.0000
841-13	0.3597	0.6403	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0040	0.0010
841-14	0.1960	0.8040	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0110	0.0030
841-15	0.5324	0.4676	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.4620	0.0080
841-16	0.5719	0.4281	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1050	0.0060
841-17	0.5881	0.4119	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000
841-18	0.0971	0.9029	0.0000	0.0000	0.6328	0.0120	0.0000	0.0000	0.0020	0.0000
841-19	0.2554	0.7446	0.0000	0.0000	0.2161	0.0100	0.0000	0.0000	0.0830	0.0070
841-20	0.3004	0.6996	0.0380	0.0094	0.2863	0.0120	0.0190	0.0040	0.5310	0.0130
841-21	0.1547	0.8453	0.0000	0.0000	0.5311	0.0130	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
841-22	0.2104	0.7896	0.0000	0.0000	0.0473	0.0080	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
841-23	0.3004	0.6996	0.0000	0.0000	0.2682	0.0120	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
841-24	0.7518	0.2482	0.0000	0.0000	0.0302	0.0030	0.0000	0.0000	0.2880	0.0050
811-1	0.2220	0.7780	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.5900	0.0090
811-2	0.0993	0.9007	0.0000	0.0000	0.0081	0.0020	0.0000	0.0000	0.2350	0.0130
811-3	0.6931	0.3069	0.0004	0.0004	0.3832	0.0110	0.0060	0.0030	0.0100	0.0010
811-4	0.2256	0.7744	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0270	0.0010
811-5	0.0993	0.9007	0.0000	0.0000	0.1215	0.0070	0.0000	0.0000	0.6880	0.0060
811-6	0.1173	0.8827	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0010	0.0000	0.0430	0.0040
811-7	0.1155	0.8845	0.0000	0.0000	0.0378	0.0070	0.0000	0.0000	0.0090	0.0010
811-8	0.2004	0.7996	0.0000	0.0000	0.0132	0.0030	0.0000	0.0000	0.0220	0.0020
811-9	0.1354	0.8646	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
811-10	0.1480	0.8520	0.0022	0.0018	0.3031	0.0140	0.0000	0.0000	0.2120	0.0080
811-11	0.1245	0.8755	0.0000	0.0000	0.0116	0.0020	0.0000	0.0000	0.4250	0.0120
811-12	0.0000	1.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000
811-13	0.1769	0.8231	0.0000	0.0000	0.3219	0.0120	0.0000	0.0000	0.0030	0.0000
811-14	0.2419	0.7581	0.0000	0.0000	0.7792	0.0100	0.0000	0.0000	0.0210	0.0020
811-15	0.1968	0.8032	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2370	0.0080
811-16	0.1715	0.8285	0.0000	0.0000	0.0085	0.0020	0.0000	0.0000	0.0040	0.0010
811-17	0.3592	0.6408	0.0000	0.0000	0.8876	0.0040	0.0000	0.0000	0.3490	0.0060
811-18	0.3303	0.6697	0.0353	0.0076	0.5971	0.0130	0.0170	0.0040	0.2280	0.0100
811-19	0.1300	0.8700	0.0000	0.0000	0.0628	0.0040	0.0000	0.0000	0.0610	0.0050
811-20	0.1968	0.8032	0.0000	0.0000	0.7881	0.0060	0.0000	0.0000	0.5350	0.0130



811-21	0.4332	0.5668	0.0000	0.0000	0.0025	0.0010	0.0010	0.0000	0.2530	0.0100
811-22	0.0776	0.9224	0.0010	0.0008	0.0001	0.0000	0.1130	0.0080	0.3500	0.0110
811-23	0.1787	0.8213	0.0000	0.0000	0.4428	0.0160	0.0000	0.0000	0.0120	0.0020
811-24	0.2527	0.7473	0.0000	0.0000	0.0519	0.0060	0.0000	0.0000	0.3590	0.0100
811-25	0.2184	0.7816	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.5580	0.0120
811-26	0.2419	0.7581	0.0000	0.0000	0.0204	0.0050	0.0000	0.0000	0.8430	0.0040
811-27	0.1805	0.8195	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.5380	0.0100
811-28	0.4242	0.5758	0.0000	0.0000	0.3555	0.0150	0.0000	0.0000	0.0050	0.0010
811-29	0.1137	0.8863	0.0430	0.0104	0.2588	0.0120	0.0480	0.0060	0.3230	0.0110
811-30	0.3357	0.6643	0.0000	0.0000	0.7775	0.0080	0.0000	0.0000	0.1060	0.0060
810-1	0.1978	0.8022	0.0000	0.0000	0.0376	0.0040	0.0000	0.0000	0.2890	0.0100
810-2	0.1421	0.8579	0.0015	0.0015	0.5519	0.0070	0.0000	0.0000	0.0240	0.0030
810-3	0.2230	0.7770	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2660	0.0060
810-4	0.1079	0.8921	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2980	0.0080
810-5	0.3597	0.6403	0.0000	0.0000	0.1153	0.0100	0.0000	0.0000	0.5540	0.0110
810-6	0.2104	0.7896	0.0000	0.0000	0.0048	0.0020	0.0000	0.0000	0.2740	0.0130
810-7	0.4317	0.5683	0.0000	0.0000	0.1992	0.0130	0.0000	0.0000	0.0260	0.0030
810-8	0.0863	0.9137	0.0004	0.0003	0.1168	0.0100	0.0020	0.0010	0.2250	0.0090
810-9	0.1871	0.8129	0.0000	0.0000	0.1303	0.0110	0.0000	0.0000	0.0380	0.0040
810-10	0.0881	0.9119	0.0000	0.0000	0.2049	0.0080	0.0000	0.0000	0.2660	0.0080
810-11	0.0845	0.9155	0.0000	0.0000	0.7150	0.0050	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
810-12	0.2464	0.7536	0.0000	0.0000	0.4381	0.0160	0.0000	0.0000	0.8080	0.0060
810-13	0.1547	0.8453	0.0000	0.0000	0.5450	0.0150	0.0000	0.0000	0.0770	0.0040
810-14	0.1331	0.8669	0.0000	0.0000	0.5291	0.0120	0.0000	0.0000	0.0550	0.0020
810-15	0.0701	0.9299	0.0000	0.0000	0.2439	0.0080	0.0000	0.0000	0.0260	0.0020
810-16	0.1565	0.8435	0.0002	0.0001	0.0366	0.0060	0.0010	0.0010	0.4040	0.0120
810-17	0.2266	0.7734	0.0000	0.0000	0.0986	0.0090	0.0000	0.0000	0.2530	0.0090
810-18	0.0809	0.9191	0.0000	0.0000	0.2168	0.0140	0.0000	0.0000	0.0020	0.0000
810-19	0.2554	0.7446	0.0000	0.0000	0.5414	0.0180	0.0000	0.0000	0.1420	0.0080
810-20	0.3112	0.6888	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.7080	0.0160
810-21	0.1619	0.8381	0.0000	0.0000	0.1351	0.0100	0.0000	0.0000	0.1330	0.0060
810-22	0.2410	0.7590	0.0000	0.0000	0.2349	0.0120	0.0010	0.0010	0.0460	0.0040
810-23	0.1457	0.8543	0.0000	0.0000	0.0002	0.0000	0.0000	0.0000	0.4720	0.0180
810-24	0.0827	0.9173	0.0000	0.0000	0.0398	0.0040	0.0000	0.0000	0.0460	0.0060
810-25	0.3597	0.6403	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0730	0.0070
809-1	0.2230	0.7770	0.0000	0.0000	0.6738	0.0100	0.0000	0.0000	0.0130	0.0030
809-2	0.2014	0.7986	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
809-3	0.0881	0.9119	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0010	0.0010
809-4	0.1079	0.8921	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0020	0.0000
809-5	0.0180	0.9820	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0280	0.0020
809-6	0.0342	0.9658	0.0000	0.0000	0.0714	0.0040	0.0000	0.0000	0.3230	0.0050
809-7	0.0396	0.9604	0.0000	0.0000	0.8144	0.0040	0.0000	0.0000	0.0010	0.0000
809-8	0.3435	0.6565	0.0000	0.0000	0.8945	0.0040	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
809-9	0.0917	0.9083	0.0000	0.0000	0.0002	0.0000	0.0030	0.0010	0.4970	0.0120
809-10	0.1817	0.8183	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2440	0.0120
809-11	0.3381	0.6619	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0370	0.0020
809-12	0.1583	0.8417	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0020	0.0000	0.0000	0.0000
809-13	0.0989	0.9011	0.0002	0.0002	0.0006	0.0000	0.0120	0.0040	0.3020	0.0100
809-14	0.7446	0.2554	0.0272	0.0046	0.0620	0.0040	0.0180	0.0020	0.6800	0.0050
809-15	0.1097	0.8903	0.0000	0.0000	0.1067	0.0060	0.0250	0.0050	0.0000	0.0000
809-16	0.2626	0.7374	0.0000	0.0000	0.5842	0.0120	0.0000	0.0000	0.1370	0.0080
809-17	0.8633	0.1367	0.0060	0.0020	0.3272	0.0030	0.0160	0.0030	1.0000	0.0000
809-18	0.1295	0.8705	0.0000	0.0000	0.3314	0.0110	0.0000	0.0000	0.1570	0.0070
809-19	0.3705	0.6295	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0120	0.0020

809-20	0.3219	0.6781	0.0025	0.0024	0.0414	0.0060	0.0400	0.0080	0.0090	0.0000
809-21	0.3165	0.6835	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0600	0.0000
809-22	0.1511	0.8489	0.0015	0.0010	0.1370	0.0000	0.0000	0.0000	0.3600	0.0100
809-23	0.3651	0.6349	0.0000	0.0000	0.0440	0.0000	0.0000	0.0000	0.0300	0.0000
809-24	0.1960	0.8040	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0400	0.0000
809-25	0.0845	0.9155	0.0000	0.0000	0.0050	0.0000	0.0000	0.0000	0.5200	0.0100
809-26	0.1871	0.8129	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0200	0.0000
809-27	0.1817	0.8183	0.1935	0.0195	0.0860	0.0000	0.2300	0.0200	0.5900	0.0100
809-28	0.0989	0.9011	0.0611	0.0081	0.1340	0.0100	0.0500	0.0100	0.9000	0.0000
809-29	0.1763	0.8237	0.0000	0.0000	0.0570	0.0000	0.0000	0.0000	0.6400	0.0100
809-30	0.2482	0.7518	0.0000	0.0000	0.1430	0.0100	0.0000	0.0000	0.4300	0.0100
809-31	0.0701	0.9299	0.0000	0.0000	0.1940	0.0000	0.0000	0.0000	0.2900	0.0000
809-32	0.3381	0.6619	0.0000	0.0000	0.2240	0.0100	0.0000	0.0000	0.4400	0.0100
809-33	0.1763	0.8237	0.0000	0.0000	0.0190	0.0000	0.0000	0.0000	0.2600	0.0100
809-34	0.1421	0.8579	0.0000	0.0000	0.0010	0.0000	0.0000	0.0000	0.1500	0.0000
809-35	0.1151	0.8849	0.0000	0.0000	0.3480	0.0000	0.0000	0.0000	0.0100	0.0000
809-36	0.0558	0.9442	0.0017	0.0013	0.0000	0.0000	0.0500	0.0000	0.3400	0.0100
809-37	0.0845	0.9155	0.0000	0.0000	0.7330	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
809-38	0.6493	0.3507	0.0000	0.0000	0.0730	0.0000	0.0000	0.0000	0.2600	0.0000
809-39	0.1673	0.8327	0.0000	0.0000	0.0700	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
827-1	0.2446	0.7554	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0200	0.0000
827-2	0.1696	0.8304	0.0000	0.0000	0.0290	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
827-3	0.4429	0.5571	0.0000	0.0000	0.8840	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
827-4	0.1250	0.8750	0.0000	0.0000	0.8750	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
827-5	0.2232	0.7768	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
827-6	0.2000	0.8000	0.0000	0.0000	0.4980	0.0100	0.0000	0.0000	0.0600	0.0000
827-7	0.2304	0.7696	0.0000	0.0000	0.1450	0.0100	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
827-8	0.2411	0.7589	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.4900	0.0100
827-9	0.2321	0.7679	0.0000	0.0000	0.0520	0.0000	0.0000	0.0000	0.0300	0.0000
827-10	0.2393	0.7607	0.0036	0.0029	0.4590	0.0200	0.0000	0.0000	0.4300	0.0100
827-11	0.1875	0.8125	0.1448	0.0112	0.5590	0.0100	0.0500	0.0000	1.0000	0.0000
827-12	0.3679	0.6321	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.3700	0.0100
827-13	0.0821	0.9179	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0300	0.0000
827-14	0.0839	0.9161	0.0001	0.0001	0.0390	0.0000	0.2800	0.0100	0.0000	0.0000
827-15	0.3536	0.6464	0.0000	0.0000	0.1580	0.0000	0.0000	0.0000	0.1300	0.0000
827-16	0.2393	0.7607	0.0001	0.0001	0.5860	0.0100	0.1300	0.0100	0.0000	0.0000
827-17	0.1714	0.8286	0.0000	0.0000	0.0260	0.0000	0.0000	0.0000	0.1100	0.0000
827-18	0.1250	0.8750	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0400	0.0000	0.0000	0.0000
827-19	0.0696	0.9304	0.0000	0.0000	0.8510	0.0000	0.0000	0.0000	0.0900	0.0000
827-20	0.2857	0.7143	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
827-21	0.6036	0.3964	0.0535	0.0074	0.4460	0.0000	0.0600	0.0000	0.2100	0.0100
827-22	0.4143	0.5857	0.0017	0.0010	0.7620	0.0100	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

## APÉNDICE V. Frecuencias alélicas por población

No. De Locus	Teloloapan		Tecoanapa		Chilpancingo		Huilotepec		Villa Seca		Telpitita		Santa Ana Maya		Villa Purificación		Tolimán		Puruándiro	
	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q
841-1	0.1233	0.8767	0.146	0.854	0.0864	0.9136	0.207	0.793	0.1816	0.8184	0.1233	0.8767	0.2608	0.7392	0.0507	0.9493	0.5831	0.4169	0.267	0.733
841-2	0.5831	0.4169	0.4447	0.5553	0.6247	0.3753	0.5808	0.4192	0.7812	0.2188	0.7258	0.2742	0.3498	0.6502	0.7463	0.2537	0.3636	0.6364	0.5102	0.4898
841-3	0.0864	0.9136	0.7385	0.2615	0.5831	0.4169	0.4166	0.5834	0.1379	0.8621	0.0167	0.9833	0.2608	0.7392	0.077	0.923	0.267	0.733	0.2232	0.7768
841-4	0.267	0.733	0.1115	0.8885	0	1	0.0421	0.9579	0.1595	0.8405	0	1	0.0639	0.9361	0.077	0.923	0	1	0	1
841-5	0.1233	0.8767	0.1286	0.8714	0.0336	0.9664	0	1	0.1379	0.8621	0.5452	0.4548	0.0862	0.9138	0.3616	0.6384	0.0336	0.9664	0.1424	0.8576
841-6	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0.7923	0.2077	1	0	1	0	1	0	1	0
841-7	0.1046	0.8954	0.0621	0.9379	0.0864	0.9136	0.2334	0.7666	0	1	0.0167	0.9833	0.1325	0.8675	0	1	0.2448	0.7552	0.2232	0.7768
841-8	0.5102	0.4898	0.393	0.607	0.2899	0.7101	0.1566	0.8434	0.2043	0.7957	0.5831	0.4169	0.3188	0.6812	0.6649	0.3351	0.1233	0.8767	0.0685	0.9315
841-9	0.1046	0.8954	0.1638	0.8362	0.2023	0.7977	0.3438	0.6562	0.2277	0.7723	0	1	0.2892	0.7108	0.1042	0.8958	0.1818	0.8182	0.267	0.733
841-10	0.1818	0.8182	0.3453	0.6547	0.3901	0.6099	0.3188	0.6812	0.2043	0.7957	0	1	0.207	0.793	0	1	0.4776	0.5224	0.3136	0.6864
841-11	0.0685	0.9315	0.2797	0.7203	0.3636	0.6364	0.0639	0.9361	0.1595	0.8405	0	1	0.453	0.547	0.025	0.975	0	1	0.2899	0.7101
841-12	0.2023	0.7977	0.3227	0.6773	0.2899	0.7101	0.3498	0.6502	0.484	0.516	0.2448	0.7552	0.1325	0.8675	0.4904	0.5096	0.3901	0.6099	0.4776	0.5224
841-13	0.2899	0.7101	0.0797	0.9203	0.1818	0.8182	0.3498	0.6502	0.0763	0.9237	0.7923	0.2077	0.2334	0.7666	1	0	0.7923	0.2077	0.3381	0.6619
841-14	0.1818	0.8182	0.393	0.607	0.2023	0.7977	0.1325	0.8675	0.2043	0.7957	0.0167	0.9833	0.5343	0.4657	0.0507	0.9493	0.0509	0.9491	0.2899	0.7101
841-15	0.5102	0.4898	1	0	0.7923	0.2077	0.5808	0.4192	1	0	0.2023	0.7977	0.6938	0.3062	0.1322	0.8678	0.4178	0.5822	0.7258	0.2742
841-16	1	0	0.3009	0.6991	0.3136	0.6864	0.6331	0.3669	0.6538	0.3462	1	0	0.4166	0.5834	1	0	0.6715	0.3285	0.6247	0.3753
841-17	1	0	0.8019	0.1981	0.5102	0.4898	0.6938	0.3062	1	0	0.2448	0.7552	1	0	0.1911	0.8089	0.5102	0.4898	1	0
841-18	0.0685	0.9315	0	1	0.1424	0.8576	0.109	0.891	0.2043	0.7957	0.0167	0.9833	0.0208	0.9792	0.077	0.923	0.3381	0.6619	0.0336	0.9664
841-19	0.267	0.733	0.0152	0.9848	0.1618	0.8382	0.3188	0.6812	0.1816	0.8184	0.4776	0.5224	0.3498	0.6502	1	0	0.0685	0.9315	0.3636	0.6364
841-20	0.3136	0.6864	0.393	0.607	0.2448	0.7552	0.1566	0.8434	0.2043	0.7957	0.4469	0.5531	0.2892	0.7108	0.4442	0.5558	0.2448	0.7552	0.2899	0.7101
841-21	0.1233	0.8767	0.3009	0.6991	0.2899	0.7101	0.0208	0.9792	0.0374	0.9626	0	1	0.3498	0.6502	0	1	0.267	0.733	0.1618	0.8382
841-22	0.0864	0.9136	0.3009	0.6991	0.1046	0.8954	0.0421	0.9579	0	1	0.5831	0.4169	0.2608	0.7392	0.5413	0.4587	0.2023	0.7977	0.2232	0.7768
841-23	0.5452	0.4548	0.1638	0.8362	0.2899	0.7101	0.2608	0.7392	0.6538	0.3462	0.0509	0.9491	0.3188	0.6812	0.5985	0.4015	0.3136	0.6864	0.1618	0.8382
841-24	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0.7258	0.2742	0.7681	0.2319	0.2222	0.7778	0.7258	0.2742	1	0
811-1	0.5452	0.4548	0.6866	0.3134	0.1233	0.8767	0.0639	0.9361	0.0964	0.9036	0	1	0.0639	0.9361	0	1	1	0	0.1233	0.8767
811-2	0.0685	0.9315	0.2797	0.7203	0.267	0.733	0.2608	0.7392	0.0185	0.9815	0	1	0.0208	0.9792	0	1	0	1	0.0864	0.9136
811-3	0.5452	0.4548	0.8019	0.1981	0.6715	0.3285	0.4921	0.5079	1	0	0.5831	0.4169	1	0	1	0	1	0	0.5831	0.4169
811-4	0.3901	0.6099	0.1286	0.8714	0.2232	0.7768	0	1	0.0763	0.9237	1	0	0	1	1	0	0.2232	0.7768	0.1233	0.8767
811-5	0.2899	0.7101	0.0462	0.9538	0.1424	0.8576	0.0639	0.9361	0.1595	0.8405	0	1	0.1325	0.8675	0.025	0.975	0.0336	0.9664	0.1046	0.8954
811-6	0.0336	0.9664	0	1	0	1	0.0639	0.9361	0.2519	0.7481	0.0685	0.9315	0.4921	0.5079	0.025	0.975	0.1424	0.8576	0.2448	0.7552
811-7	0.1818	0.8182	0.0621	0.9379	0.0509	0.9491	0.4166	0.5834	0.0566	0.9434	0.0509	0.9491	0.2608	0.7392	0	1	0	1	0.2023	0.7977
811-8	0.2448	0.7552	0.3453	0.6547	0.0509	0.9491	0.0639	0.9361	0.0374	0.9626	0.5831	0.4169	0.1566	0.8434	0.5985	0.4015	0.0167	0.9833	0.2023	0.7977
811-9	0.1818	0.8182	0.0782	0.9218	0.1046	0.8954	0.0208	0.9792	0.3295	0.6705	0.0167	0.9833	0.0421	0.9579	0.0507	0.9493	0.5831	0.4169	0.0509	0.9491
811-10	0.267	0.733	0.0782	0.9218	0.1424	0.8576	0.0862	0.9138	0.1595	0.8405	0.0864	0.9136	0.109	0.891	0.025	0.975	0.267	0.733	0.2448	0.7552
811-11	0.1046	0.8954	0.1638	0.8362	0.1424	0.8576	0.2608	0.7392	0.1379	0.8621	0	1	0.1566	0.8434	0.077	0.923	0	1	0.2448	0.7552
811-12	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
811-13	0.2023	0.7977	0.3687	0.6313	0.1046	0.8954	0.0208	0.9792	0.0763	0.9237	0.2448	0.7552	0.0639	0.9361	0.5413	0.4587	0	1	0.2899	0.7101
811-14	0.1818	0.8182	0.1286	0.8714	0.2899	0.7101	0.3823	0.6177	0.1816	0.8184	0.1818	0.8182	0.1325	0.8675	0.0507	0.9493	0.5831	0.4169	0.3636	0.6364
811-15	0.3381	0.6619	0.5017	0.4983	0.1818	0.8182	0.0421	0.9579	0.1595	0.8405	0	1	0.1325	0.8675	0.025	0.975	0.2899	0.7101	0.267	0.733
811-16	0.0864	0.9136	0.1115	0.8885	0.2448	0.7552	0.3188	0.6812	0.3295	0.6705	0	1	0.3498	0.6502	0	1	0.267	0.733	0.1046	0.8954
811-17	0.3381	0.6619	0.3009	0.6991	0.3901	0.6099	0.1566	0.8434	0.4173	0.5827	0.7258	0.2742	0.2608	0.7392	1	0	0.2618	0.7382	0.3636	0.6364
811-18	0.2448	0.7552	0.3687	0.6313	0.2448	0.7552	0.207	0.793	0.3026	0.6974	0.5102	0.4898	0.2892	0.7108	0.4442	0.5558	0.267	0.733	0.4469	0.5531
811-19	0.2232	0.7768	0.1286	0.8714	0.1233	0.8767	0.2334	0.7666	0.2768	0.7232	0	1	0.0862	0.9138	0	1	0.0685	0.9315	0.1618	0.8382
811-20	0.2448	0.7552	0.182	0.818	0.2232	0.7768	0.0421	0.9579	0.2277	0.7723	0.2023	0.7977	0.1814	0.8186	0.025	0.975	0.4469	0.5531	0.1424	0.8576
811-21	0.4469	0.5531	0.5662	0.4338	0.6247	0.3753	0.4921	0.5079	0.4173	0.5827	0.3636	0.6364	0.2608	0.7392	1	0	0.2899	0.7101	0.2899	0.7101

811-22	0.0685	0.9315	0.0462	0.9538	0.1233	0.8767	0.0208	0.9792	0.0964	0.9036	0.0167	0.9833	0.1566	0.8434	0.025	0.975	0.0167	0.9833	0.2023	0.7977
811-23	0.2448	0.7552	0.0462	0.9538	0.1424	0.8576	0.3188	0.6812	0.2519	0.7481	0.0864	0.9136	0.0639	0.9361	0.5413	0.4587	0.0509	0.9491	0.267	0.733
811-24	0.3136	0.6864	0.3009	0.6991	0.3381	0.6619	0.0421	0.9579	0.1816	0.8184	0.6247	0.3753	0.1325	0.8675	0.1322	0.8678	0.2232	0.7768	0.2448	0.7552
811-25	0.1818	0.8182	0.3687	0.6313	0.0509	0.9491	0.0421	0.9579	0.2768	0.7232	0.3381	0.6619	0.207	0.793	0.5985	0.4015	0.1424	0.8576	0.1818	0.8182
811-26	0.1424	0.8576	0.642	0.358	0.3381	0.6619	0.1566	0.8434	0.1379	0.8621	0.1424	0.8576	0.1814	0.8186	0.1042	0.8958	0.4178	0.5822	0.1818	0.8182
811-27	0.0336	0.9664	0.0462	0.9538	0.2023	0.7977	0.5808	0.4192	0.3866	0.6134	0	1	0.3823	0.6177	0.0507	0.9493	0.1046	0.8954	0.2899	0.7101
811-28	0.6247	0.3753	0.2196	0.7804	0.1424	0.8576	0.2608	0.7392	0.7111	0.2889	0.5452	0.4548	0.3188	0.6812	1	0	0.6247	0.3753	0.4178	0.5822
811-29	0.1618	0.8382	0.0782	0.9218	0.1233	0.8767	0.1566	0.8434	0.1169	0.8831	0.0509	0.9491	0.207	0.793	0	1	0.1233	0.8767	0.1046	0.8954
811-30	0.2232	0.7768	0.5017	0.4983	0.3901	0.6099	0.2608	0.7392	0.3295	0.6705	0.4178	0.5822	0.207	0.793	1	0	0.0864	0.9136	0.4178	0.5822
810-1	0.267	0.733	0.2196	0.7804	0.3901	0.6099	0.453	0.547	0.0964	0.9036	0.1424	0.8576	0.109	0.891	0.0507	0.9493	0.0864	0.9136	0.2023	0.7977
810-2	0.1233	0.8767	0.2797	0.7203	0.1424	0.8576	0.1566	0.8434	0.2277	0.7723	0	1	0.109	0.891	0.1611	0.8389	0.1818	0.8182	0.0509	0.9491
810-3	0	1	0.5017	0.4983	0.3636	0.6364	0.0421	0.9579	0.0374	0.9626	0.6247	0.3753	0.0862	0.9138	0.6649	0.3351	0.1424	0.8576	0.1233	0.8767
810-4	0.1046	0.8954	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0.0208	0.9792	1	0	0	1	0	1
810-5	0.5102	0.4898	0.6023	0.3977	0.6715	0.3285	0.2608	0.7392	0.484	0.516	0	1	0.4166	0.5834	0	1	0.4469	0.5531	0.3636	0.6364
810-6	0.3136	0.6864	0.0462	0.9538	0.1618	0.8382	0.3823	0.6177	0.3574	0.6426	0.0336	0.9664	0.207	0.793	0	1	0.3901	0.6099	0.3136	0.6864
810-7	0.3901	0.6099	0.6866	0.3134	0.2448	0.7552	0.2334	0.7666	0.3295	0.6705	0.5831	0.4169	0.5808	0.4192	0.7463	0.2537	0.4776	0.5224	0.2899	0.7101
810-8	0	1	0.0621	0.9379	0.1818	0.8182	0.109	0.891	0.0566	0.9434	0.0509	0.9491	0.1325	0.8675	0	1	0.1046	0.8954	0.1618	0.8382
810-9	0.267	0.733	0.4182	0.5818	0.2023	0.7977	0.0862	0.9138	0.3295	0.6705	0	1	0.109	0.891	0	1	0.1818	0.8182	0.2448	0.7552
810-10	0.1424	0.8576	0.1115	0.8885	0.0864	0.9136	0.0421	0.9579	0.0964	0.9036	0	1	0.0208	0.9792	0	1	0.2899	0.7101	0.0685	0.9315
810-11	0.1818	0.8182	0.0621	0.9379	0.3136	0.6864	0	1	0.2277	0.7723	0	1	0.0639	0.9361	0	1	0.0167	0.9833	0	1
810-12	0.0685	0.9315	0	1	0.0167	0.9833	0.207	0.793	0.3026	0.6974	0.5102	0.4898	0.2608	0.7392	0.7463	0.2537	0.6247	0.3753	0.2448	0.7552
810-13	0.1233	0.8767	0.0305	0.9695	0.2448	0.7552	0.2608	0.7392	0.2519	0.7481	0	1	0.1814	0.8186	0	1	0.4469	0.5531	0.0864	0.9136
810-14	0.0509	0.9491	0.0305	0.9695	0.1233	0.8767	0	1	0.0566	0.9434	0.5452	0.4548	0.0862	0.9138	0.2222	0.7778	0.1233	0.8767	0.2023	0.7977
810-15	1	0	0.0305	0.9695	0.0509	0.9491	0.109	0.891	0.1816	0.8184	0.0509	0.9491	0.0639	0.9361	0.2546	0.7454	0.0336	0.9664	0.0336	0.9664
810-16	0.2448	0.7552	0.3453	0.6547	0.1424	0.8576	0.109	0.891	0.0763	0.9237	0.0685	0.9315	0.1566	0.8434	0.077	0.923	0.2232	0.7768	0.0864	0.9136
810-17	0.1046	0.8954	0.1115	0.8885	0.1818	0.8182	0.0208	0.9792	0.2519	0.7481	1	0	0.1566	0.8434	0.6649	0.3351	0.267	0.733	0.1233	0.8767
810-18	0.1818	0.8182	0	1	0.0336	0.9664	0	1	0.0566	0.9434	0	1	0.0208	0.9792	0.4442	0.5558	0.0167	0.9833	0.2232	0.7768
810-19	0.2023	0.7977	0.182	0.818	0	1	0.109	0.891	0.3866	0.6134	0.2899	0.7101	0.2608	0.7392	0.6649	0.3351	0.5831	0.4169	0.2023	0.7977
810-20	0.4178	0.5822	0.6866	0.3134	0.3636	0.6364	0.7681	0.2319	0.3295	0.6705	0	1	0.3498	0.6502	0	1	0.2232	0.7768	0.267	0.733
810-21	0.0336	0.9664	0.2005	0.7995	0.0685	0.9315	0.0208	0.9792	0.1169	0.8831	0.4178	0.5822	0.207	0.793	0.7463	0.2537	0.1046	0.8954	0.0685	0.9315
810-22	0.1424	0.8576	0.3687	0.6313	0.1618	0.8382	0.1566	0.8434	0.0964	0.9036	0.2023	0.7977	0.2608	0.7392	0.4442	0.5558	0.4178	0.5822	0.267	0.733
810-23	0.1424	0.8576	0.182	0.818	0.3381	0.6619	0.0421	0.9579	0.2277	0.7723	0	1	0.1814	0.8186	0	1	0.0509	0.9491	0.2899	0.7101
810-24	0.2899	0.7101	0.0462	0.9538	0.0509	0.9491	0.3188	0.6812	0.0566	0.9434	0	1	0.0862	0.9138	0	1	0.0509	0.9491	0	1
810-25	0.267	0.733	0.0782	0.9218	0.1818	0.8182	0.2334	0.7666	0.6538	0.3462	0.6715	0.3285	0.5343	0.4657	0.7463	0.2537	0.3381	0.6619	0.3901	0.6099
809-1	0	1	0.2005	0.7995	0.2899	0.7101	0	1	0.0964	0.9036	0.4469	0.5531	0.3188	0.6812	1	0	0.1424	0.8576	0.3136	0.6864
809-2	0	1	0.3453	0.6547	0.2013	0.7987	0	1	0.0763	0.9237	0.1424	0.8576	0.3823	0.6177	0.1911	0.8089	0.6715	0.3285	0.1818	0.8182
809-3	0.1233	0.8767	0	1	0.0864	0.9136	0	1	0.4173	0.5827	0	1	0.2334	0.7666	0.0507	0.9493	0	1	0.0864	0.9136
809-4	0.0864	0.9136	0.1286	0.8714	0.1233	0.8767	0	1	0.2043	0.7957	0	1	0	1	0.4904	0.5096	0.1046	0.8954	0.1046	0.8954
809-5	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0.109	0.891	0	1	0	1	0.0864	0.9136
809-6	0	1	0	1	0.1424	0.8576	0	1	0	1	0	1	0	1	0.2546	0.7454	0	1	0.0336	0.9664
809-7	0	1	0	1	0.1618	0.8382	0	1	0.1169	0.8831	0.1424	0.8576	0	1	0	1	0	1	0	1
809-8	0.1618	0.8382	0.4447	0.5553	0.3901	0.6099	0.2334	0.7666	0.1379	0.8621	0.0167	0.9833	0.6331	0.3669	0.7463	0.2537	1	0	0.3901	0.6099
809-9	0.1818	0.8182	0	1	0.0864	0.9136	0.0208	0.9792	0.1595	0.8405	0.0509	0.9491	0.2334	0.7666	0.0507	0.9493	0.0509	0.9491	0.1424	0.8576
809-10	0.0685	0.9315	0.0621	0.9379	0.0336	0.9664	0.0208	0.9792	0.3295	0.6705	0.267	0.733	0.207	0.793	0.5985	0.4015	0.1424	0.8576	0.3636	0.6364
809-11	0.3136	0.6864	0.5017	0.4983	0.3636	0.6364	0.2608	0.7392	0.2277	0.7723	0.2448	0.7552	0.3188	0.6812	1	0	0.5102	0.4898	0.1046	0.8954
809-12	0.1046	0.8954	0.0152	0.9848	0.0864	0.9136	0.0639	0.9361	0.4173	0.5827	0.1618	0.8382	0.5343	0.4657	0.025	0.975	0.2232	0.7768	0.1233	0.8767
809-13	0.0167	0.9833	0.0621	0.9379	0.1046	0.8954	0.109	0.891	0.1379	0.8621	0.0167	0.9833	2.608	-1.608	0	1	0.1424	0.8576	0.1618	0.8382
809-14	0.7923	0.2077	1	0	0.7923	0.2077	0.5808	0.4192	0.6046	0.3954	1	0	0.6331	0.3669	1	0	0.6715	0.3285	0.7258	0.2742
809-15	0.1818	0.8182	0.0782	0.9218	0.1233	0.8767	0.1566	0.8434	0.3026	0.6974	0.0509	0.9491	0.0208	0.9792	0	1	0.0685	0.9315	0.1233	0.8767
809-16	0.0509	0.9491	0.1638	0.8362	0.3136	0.6864	0.2324	0.7676	0.3295	0.6705	0.6715	0.3285	0.3498	0.6502	1	0	0.0336	0.9664	0.1818	0.8182
809-17	0.0001	0.9999	1	0	0.7923	0.2077	1	0	1	0	0.7923	0.2077	1	0	0.5985	0.4015	1	0	1	0

809-18 0.1233 0.8767 0.1115 0.8885 0.0685 0.9315 0 1 0.0763 0.9237 0.3381 0.6619 0.1814 0.8186 0.0507 0.9493 0.267 0.733 0.0685 0.9315

809-19 0.3636 0.6364 0.4447 0.5553 0.2232 0.7768 0.3498 0.6502 0.7111 0.2889 0.0864 0.9136 0.3823 0.6177 0.5985 0.4015 0.2232 0.7768 0.6715 0.3285

809-20 0.2899 0.7101 0.5662 0.4338 0.2899 0.7101 0.2608 0.7392 0.1816 0.8184 0.267 0.733 0.453 0.547 0.4014 0.5986 0.3901 0.6099 0.1818 0.8182

809-21 0.2232 0.7768 0.3227 0.6773 0.4469 0.5531 0.2892 0.7108 0.3295 0.6705 0.7923 0.2077 0.1325 0.8675 0.4904 0.5096 0.2023 0.7977 0.1618 0.8382

809-22 0.1618 0.8382 0.2591 0.7409 0.1046 0.8954 0.0639 0.9361 0.2519 0.7481 0.0336 0.9664 0.1814 0.8186 0.025 0.975 0.267 0.733 0.1424 0.8576

809-23 0.267 0.733 0.3453 0.6547 0.2023 0.7977 0.6331 0.3669 0.3026 0.6974 0.267 0.733 0.453 0.547 0.5985 0.4015 0.267 0.733 0.5831 0.4169

809-24 0.0864 0.9136 0.1286 0.8714 0.2232 0.7768 0.3188 0.6812 0.2277 0.7723 0 1 0.453 0.547 0.025 0.975 0.1818 0.8182 0.4469 0.5531

809-25 0.0509 0.9491 0.0152 0.9848 0.0509 0.9491 0.0208 0.9792 0.1816 0.8184 0 1 0.1566 0.8434 0.2546 0.7454 0.1046 0.8954 0.1046 0.8954

809-26 0.1233 0.8767 0.0947 0.9053 0.1233 0.8767 0.3498 0.6502 0.2043 0.7957 0.4776 0.5224 0.0421 0.9579 0.4014 0.5986 0.1618 0.8382 0.0685 0.9315

809-27 0.2023 0.7977 0.2591 0.7409 0.2448 0.7552 0.1814 0.8186 0.0964 0.9036 0.0864 0.9136 0.1566 0.8434 0.1911 0.8089 0.2448 0.7552 0.1618 0.8382

809-28 0.0864 0.9136 0.0947 0.9053 0.0336 0.9664 0.0421 0.9579 0.1379 0.8621 0.2023 0.7977 0.109 0.891 0.025 0.975 0.0864 0.9136 0.1424 0.8576

809-29 0.1818 0.8182 0.0152 0.9848 0.1046 0.8954 0.453 0.547 0.1379 0.8621 0.1618 0.8382 0.0862 0.9138 0.6649 0.3351 0.1618 0.8382 0.1424 0.8576

809-30 0.0685 0.9315 0.393 0.607 0.3901 0.6099 0.0639 0.9361 0.1595 0.8405 0.4178 0.5822 0.1814 0.8186 0.4442 0.5558 0.2023 0.7977 0.267 0.733

809-31 0.0509 0.9491 0 1 0.0167 0.9833 0.0862 0.9138 0.1169 0.8831 0.0167 0.9833 0.1325 0.8675 0.4014 0.5986 0.0167 0.9833 0.0509 0.9491

809-32 0.5452 0.4548 0.0621 0.9379 0.2023 0.7977 0.6938 0.3062 0.3574 0.6426 0.1618 0.8382 0.3188 0.6812 1 0 0.3136 0.6864 0.4469 0.5531

809-33 0.0864 0.9136 0.2196 0.7804 0.2023 0.7977 0 1 0.1595 0.8405 0.2448 0.7552 0.2892 0.7108 0.025 0.975 0.2232 0.7768 0.267 0.733

809-34 0.0336 0.9664 0.3009 0.6991 0.1046 0.8954 0 1 0.0566 0.9434 0.267 0.733 0.1325 0.8675 0.324 0.676 0.2232 0.7768 0.0336 0.9664

809-35 0.0167 0.9833 0.0305 0.9695 0.0685 0.9315 0.1814 0.8186 0.1595 0.8405 0.3381 0.6619 0 1 0.2222 0.7778 0.1046 0.8954 0.1046 0.8954

809-36 0.0336 0.9664 0 1 0.0509 0.9491 0.0639 0.9361 0.0964 0.9036 0 1 0.1814 0.8186 0 1 0.0685 0.9315 0.0864 0.9136

809-37 0 1 0.1115 0.8885 0.0864 0.9136 0.1566 0.8434 0.2043 0.7957 0 1 0.0421 0.9579 0.1322 0.8678 0.1233 0.8767 0.0336 0.9664

809-38 0.7923 0.2077 0.5662 0.4338 0.2899 0.7101 0.7681 0.2319 1 0 0.6247 0.3753 0.6938 0.3062 1 0 0.7258 0.2742 0.6715 0.3285

809-39 0.2023 0.7977 0.146 0.854 0.2232 0.7768 0.0208 0.9792 0.0374 0.9626 0 1 0.5808 0.4192 0 1 0.4469 0.5531 0.1618 0.8382

827-1 0.1818 0.8182 0.2196 0.7804 0.1818 0.8182 0.0421 0.9579 0.2043 0.7957 1 0 0.0862 0.9138 0.2222 0.7778 1 0 0.0336 0.9664

827-2 0.0685 0.9315 0.3009 0.6991 0.3636 0.6364 0.0639 0.9361 0.0374 0.9626 0.0685 0.9315 0.2608 0.7392 0.077 0.923 0.0685 0.9315 0.4178 0.5822

827-3 0.6715 0.3285 0.2591 0.7409 0.1818 0.8182 0.5808 0.4192 0.7812 0.2188 0.5452 0.4548 0.453 0.547 0.6649 0.3351 0.4469 0.5531 0.267 0.733

827-4 0.0509 0.9491 0.3227 0.6773 0.0685 0.9315 0.3498 0.6502 0.2519 0.7481 0.1233 0.8767 0 1 0 1 0.0167 0.9833 0.1046 0.8954

827-5 0.3636 0.6364 0.0782 0.9218 0.4178 0.5822 0.0421 0.9579 0.0964 0.9036 0.2448 0.7552 0 1 0.2546 0.7454 0.5831 0.4169 0.267 0.733

827-6 0.3136 0.6864 0.3009 0.6991 0.1424 0.8576 0.0639 0.9361 0.3026 0.6974 0.0864 0.9136 0.2608 0.7392 0.025 0.975 0.3636 0.6364 0.1233 0.8767

827-7 0.0509 0.9491 0.2005 0.7995 0.1818 0.8182 0.1325 0.8675 0.3574 0.6426 0.5452 0.4548 0.0421 0.9579 1 0 0.2023 0.7977 0.1618 0.8382

827-8 0.0864 0.9136 0.0305 0.9695 0.2023 0.7977 0.1325 0.8675 0.1169 0.8831 0.6715 0.3285 0.1325 0.8675 0.7463 0.2537 0.5452 0.4548 0.2023 0.7977

827-9 0.4469 0.5531 0.146 0.854 0.2899 0.7101 0.2608 0.7392 0.4496 0.5504 0.0685 0.9315 0.2608 0.7392 0.025 0.975 0.2232 0.7768 0.2023 0.7977

827-10 0.2448 0.7552 0.2797 0.7203 0.3381 0.6619 0.4921 0.5079 0.2043 0.7957 0.1818 0.8182 0.1566 0.8434 0.0507 0.9493 0.1818 0.8182 0.267 0.733

827-11 0.2023 0.7977 0.182 0.818 0.2023 0.7977 0.0639 0.9361 0.1595 0.8405 0.3381 0.6619 0.1814 0.8186 0.1322 0.8678 0.2013 0.7987 0.1618 0.8382

827-12 0.4178 0.5822 0.393 0.607 0.3381 0.6619 0.1325 0.8675 0.2277 0.7723 0.7923 0.2077 0.1814 0.8186 1 0 0.6715 0.3285 0.1233 0.8767

827-13 0.0509 0.9491 0.2591 0.7409 0.2899 0.7101 0.1566 0.8434 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0.0685 0.9315

827-14 0.1046 0.8954 0.0782 0.9218 0.0336 0.9664 0.0862 0.9138 0.3295 0.6705 0.0509 0.9491 0.0639 0.9361 0 1 0.1046 0.8954 0.0167 0.9833

827-15 0.2899 0.7101 0.2196 0.7804 0.2448 0.7552 0.3498 0.6502 0.4173 0.5827 0.6247 0.3753 0.2892 0.7108 0.4904 0.5096 0.2448 0.7552 0.5102 0.4898

827-16 0.267 0.733 0.146 0.854 0.3381 0.6619 0.1814 0.8186 0.0763 0.9237 0.3381 0.6619 0.453 0.547 0.1911 0.8089 0.2448 0.7552 0.2023 0.7977

827-17 0.0685 0.9315 0.1286 0.8714 0.0864 0.9136 0.0639 0.9361 0.1595 0.8405 0.2232 0.7768 0.3498 0.6502 1 0 0.0336 0.9664 0.2232 0.7768

827-18 0.0336 0.9664 0.0621 0.9379 0.1424 0.8576 0.109 0.891 0.1595 0.8405 0.1233 0.8767 0.1566 0.8434 0.025 0.975 0.0167 0.9833 0.4776 0.5224

827-19 0.1046 0.8954 0.0152 0.9848 0.0864 0.9136 0.3498 0.6502 0.1169 0.8831 0.0167 0.9833 0.0639 0.9361 0 1 0.0167 0.9833 0.0167 0.9833

827-20 0.0636 0.9364 0.2391 0.7609 0.3381 0.6619 0.2608 0.7392 1 0 0.267 0.733 0.3823 0.6177 0.0507 0.9493 0.2023 0.7977 0.5102 0.4898

827-21 0.4776 0.5224 0.5017 0.4983 0.7258 0.2742 0.4921 0.5079 0.5208 0.4792 0.5452 0.4548 0.6938 0.3062 0.7463 0.2537 0.7258 0.2742 0.7258 0.2742

827-22 0.6247 0.3753 0.2797 0.7203 0.5831 0.4169 0.3498 0.6502 0.5208 0.4792 0.4178 0.5822 0.207 0.793 0.2884 0.7116 0.4178 0.5822 0.4776 0.5224

**APÉNDICE VI.** Tablas de resumen AMOVA para diferente tipo de agrupamiento: a) entre subespecies; b) entre razas; c) razas dentro de *ssp. mexicana* y d) razas dentro de *ssp. parviglumis*

ORIGEN DE VARIACIÓN	g. 1.	SUMA DE CUADRADOS	COMPONENTES DE LA VARIANZA	PORCENTAJE DE LA VARIACIÓN
Entre subespecies	1	206.926	0.20229	0.72
Entre poblaciones de cada subespecie	8	1473.530	5.84785	20.92
Entre poblaciones	268	5868.605	21.89778	78.35
		7549.061	27.94792	

ORIGEN DE VARIACIÓN	g. 1.	SUMA DE CUADRADOS	COMPONENTES DE LA VARIANZA	PORCENTAJE DE LA VARIACIÓN
Entre razas	3	735.247	1.36694	4.85573
Entre poblaciones de cada raza	6	945.21	4.88632	17.35751
Entre poblaciones	268	5868.605	21.89778	77.78675
		7549.061	28.15104	

ORIGEN DE VARIACIÓN	g. 1.	SUMA DE CUADRADOS	COMPONENTES DE LA VARIANZA	PORCENTAJE DE LA VARIACIÓN
Entre razas de la <i>ssp. mexicana</i>	1	111.031	1.06234	3.81
Entre poblaciones de cada raza	1	72.004	1.76162	6.33
Dentro de las poblaciones	78	1952.126	25.02726	89.86
	80	2135.160	27.85121	

ORIGEN DE VARIACIÓN	g. 1.	SUMA DE CUADRADOS	COMPONENTES DE LA VARIANZA	PORCENTAJE DE LA VARIACIÓN
Entre razas de la <i>ssp. parviglumis</i>	1	417.290	2.53138	8.84
Entre poblaciones de cada raza	5	873.206	5.50554	19.22
Dentro de las poblaciones	190	3916.479	20.61305	71.95
	196	5206.975	28.64996	

## APÉNDICE VII

Proporción de alelos que pertenecen a cada grupo en agrupamientos con alta verosimilitud (k=2 y k =5).

<b>Población</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
PAR1	<b>0.978</b>	<b>0.022</b>
PAR2	<b>0.990</b>	<b>0.010</b>
PAR3	<b>0.987</b>	<b>0.013</b>
PAR4	<b>0.997</b>	<b>0.003</b>
PAR5	<b>0.993</b>	<b>0.007</b>
PAR6	<b>0.008</b>	<b>0.992</b>
PAR7	<b>0.993</b>	<b>0.007</b>
MEX1	<b>0.004</b>	<b>0.996</b>
MEX2	<b>0.975</b>	<b>0.025</b>
MEX3	<b>0.984</b>	<b>0.016</b>

Población	Grupos				
	1	2	3	4	5
PAR1	0.021	0.046	0.020	0.066	0.848
PAR2	0.007	0.010	0.007	0.969	0.006
PAR3	0.133	0.028	0.013	0.751	0.075
PAR4	0.015	0.006	0.003	0.013	0.963
PAR5	0.259	0.018	0.009	0.014	0.700
PAR6	0.011	0.006	0.968	0.006	0.009
PAR7	0.953	0.018	0.006	0.013	0.011
MEX1	0.007	0.004	0.981	0.003	0.004
MEX2	0.018	0.945	0.012	0.011	0.015
<b>MEX3</b>	0.824	0.017	0.013	0.059	0.087

## APÉNDICE VIII

Valores de probabilidad posterior para cada locus obtenidos mediante el programa BayeScan (Foll y Gaggiotti, 2008). En rojo valores de probabilidad para loci candidatos a estar sujetos a selección natural.

	prob	811-12	0.45009	810-18	0.052611	809-29	0.05021
841-1	0.0642128	811-13	0.05101	810-19	0.059412	809-30	0.062012
841-2	0.077015	811-14	0.061812	810-20	0.16283	809-31	0.084417
841-3	0.085617	811-15	0.045209	810-21	0.043809	809-32	0.055611
841-4	0.052611	811-16	0.046609	810-22	0.13723	809-33	0.062813
841-5	0.053811	811-17	0.05021	810-23	0.044809	809-34	0.059012
841-6	0.35947	811-18	0.44729	810-24	0.045809	809-35	0.074615
841-7	0.052611	811-19	0.071614	810-25	0.04821	809-36	0.084817
841-8	0.047009	811-20	0.09762	809-1	0.26385	809-37	0.079616
841-9	0.077816	811-21	0.060612	809-2	0.19244	809-38	0.05181
841-10	0.04961	811-22	0.12903	809-3	0.086217	809-39	0.13223
841-11	0.095019	811-23	0.05101	809-4	0.04841	827-1	0.66533
841-12	0.11242	811-24	0.071414	809-5	0.067814	827-2	0.04881
841-13	0.09982	811-25	0.055411	809-6	0.062012	827-3	0.05121
841-14	0.04801	811-26	0.04981	809-7	0.054211	827-4	0.04801
841-15	0.053011	811-27	0.077215	809-8	0.18964	827-5	0.097019
841-16	0.070614	811-28	0.074615	809-9	0.065813	827-6	0.072014
841-17	0.066013	811-29	0.44549	809-10	0.05041	827-7	0.05201
841-18	0.045609	811-30	0.04861	809-11	0.046009	827-8	0.052611
841-19	0.054411	810-1	0.067413	809-12	0.061812	827-9	0.068014
841-20	0.53991	810-2	0.11502	809-13	0.075415	827-10	0.17744
841-21	0.04841	810-3	0.15303	809-14	0.092218	827-11	0.83697
841-22	0.05001	810-4	0.9808	809-15	0.084817	827-12	0.073615
841-23	0.046009	810-5	0.10562	809-16	0.067013	827-13	0.067413
841-24	0.062412	810-6	0.045209	809-17	0.21504	827-14	0.076215
811-1	0.9874	810-7	0.05141	809-18	0.09982	827-15	0.14603
811-2	0.054611	810-8	0.095019	809-19	0.045009	827-16	0.13403
811-3	0.05221	810-9	0.05101	809-20	0.11862	827-17	0.046209
811-4	0.90238	810-10	0.071014	809-21	0.05141	827-18	0.055211
811-5	0.074415	810-11	0.064613	809-22	0.18164	827-19	0.061612
811-6	0.12262	810-12	0.29986	809-23	0.062212	827-20	0.17784
811-7	0.05041	810-13	0.047009	809-24	0.047009	827-21	0.23225
811-8	0.046809	810-14	0.056811	809-25	0.088218	827-22	0.092418
811-9	0.055211	810-15	0.17263	809-26	0.070814		
811-10	0.22384	810-16	0.25785	809-27	0.80876		
811-11	0.057411	810-17	0.04921	809-28	0.71794		



**APÉNDICE IX.** Escala de interpretación de Jeffreys para distintos valores de probabilidad posterior. Tomado y modificado de Foll y Gaggiotti (2008).

$P(\alpha \neq 0)$	Bayes Factor (BF)	$\log_{10}(\text{BF})$	Interpretación de Jeffreys*
0.50 → 0.76	1 → 3	0 → 0.5	Apenas merece mención
0.76 → 0.91	3 → 10	0.5 → 1	Substancial
0.91 → 0.97	10 → 32	1 → 1.5	Fuerte
0.97 → 0.99	32 → 100	1.5 → 2	Muy Fuerte
0.99 → 1.00	100 → $\infty$	2 → $\infty$	Decisivo

\*Modificado para traducir la interpretación al español