

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 15 / N° 20 / 2013 / 52–60

## Caracterización genética de razas de maíz autóctonas de Misiones, Argentina

### Genetic characterization of maize landraces from Misiones, Argentina

Mariana Bracco, Verónica V. Lia, Lidia Poggio, Julián A. Cámara Hernández, Alexandra M. Gottlieb

#### Resumen

En el norte de la Argentina habitan comunidades aborígenes Guaraníes que cultivan razas nativas de maíz. La caracterización genética del germoplasma autóctono, en particular de las razas de la Provincia de Misiones, es sumamente escasa. Con el fin de aportar al conocimiento de la diversidad genética y la estructura poblacional de estas razas nativas, contribuir a su conservación y evaluar su potencial como reservorio de nuevos alelos, se evaluaron 15 loci microsatélites nucleares en 467 individuos. Los resultados del presente estudio permiten concluir que: 1) Las razas de Misiones se encuentran constituidas por acervos génicos diferentes, que concuerdan con el tipo de grano que poseen, es decir, harinosos/córneo-harinosos y reventadores, grupos que deberían ser considerados como unidades de conservación diferentes; y 2) las razas nativas de Misiones constituyen una reserva de diversidad significativa, con potencial para ampliar la base genética de los programas de fitomejoramiento.

Palabras clave: Diversidad genética; Razas nativas de maíz; Conservación del germoplasma; Microsatélites; Provincia de Misiones.

#### Abstract

Northern aboriginal communities from Argentina cultivate maize landraces for self-sufficiency. Genetic characterization of indigenous germplasm from Misiones Province is extremely limited. To contribute to the knowledge and conservation of the genetic diversity of these native maize landraces and to assess their potential as a reservoir of novel alleles, 467 individuals were evaluated using 15 nuclear microsatellite loci. The results of this study allow to conclude that: 1) landraces from Misiones can be divided into two different gene pools, which are consistent with the type of corn (flints and flours vs. popcorns), these should be regarded as different conservation units; and 2) Misiones landraces represent a significant reservoir of diversity, useful to broaden the genetic base of breeding programs.

Keywords: Genetic diversity; Maize landraces; Germplasm conservation; Microsatellites; Misiones Province.

#### Introducción

El norte de la Argentina alberga numerosas razas autóctonas de maíz que constituyen un invaluable recurso. Particularmente en la Provincia de Misiones se identificaron 15 razas nativas, cuyas diferencias radican principalmente en ciertos atributos de las espigas (1). Estas razas son cultivadas para consumo familiar por comunidades de la etnia Guaraní, quienes son los guardianes de la enorme riqueza biológica contenida en dichas razas, preservándolas mediante prácticas agrícolas tradicionales. Los sistemas de cultivo de estas comunidades están basados en la provisión del maíz para satisfacer las necesidades alimentarias de la comunidad, proporcionando además el contexto cultural dentro del cual se transmiten los valores familiares y del trabajo (2). En lo que respecta a la cosmovisión, el maíz es protagonista de las celebraciones rituales y religiosas de estos grupos originarios (3).

Por lo expuesto, cuando una variedad tradicional de maíz se extingue, la comunidad pierde un fragmento de su Historia y de su Cultura. Además de su valor intrínseco, las variedades autóctonas de maíz poseen numerosos caracteres agronómicos que representan una riqueza potencial para la agricultura moderna. No obstante las razas nativas cultivadas por los pequeños grupos de agricultores aborígenes están cada vez más amenazadas por el reemplazo con germoplasma comercial de alto rendimiento. Es así que, hoy en día, las razas nativas de maíz que se desarrollan en el territorio de nuestro país se enfrentan a dos riesgos principales. Uno de éstos consiste en el avance y la transformación de la frontera agrícola, lo que ha provocado importantes cambios estructurales y funcionales en el sector rural, por la rápida expansión de los límites de las zonas de cultivo a expensas de los bosques naturales del norte y las tierras de pastoreo (4). Por otro lado, a medida

que los híbridos y variedades comerciales de maíz se hacen más atractivos frente a las razas nativas, la persistencia del acervo genético de estas últimas se ve cada vez más amenazada. Por ello, a menos que se realicen esfuerzos especiales para proteger y resguardar el germoplasma autóctono, así como para fomentar su cultivo permanente, estas reservas genéticas se irán erosionando con el paso del tiempo.

Como paso inicial para el desarrollo de estrategias eficientes para la conservación de las razas nativas de maíz, es de suma importancia su estudio y caracterización. El presente trabajo tiene como objetivo general aportar al conocimiento de la diversidad genética de razas nativas de maíz de la Provincia de Misiones, evaluando su potencial como fuente de germoplasma para planes biotecnológicos y de mejoramiento.

## Materiales y métodos

Los ejemplares fueron cedidos directamente por los cultivadores aborígenes de la etnia Guaraní; los sitios de colección corresponden a aldeas de las comunidades visitadas (ubicación geográfica de las aldeas: Pozo azul 26°21'16.62" S -54°11'21.97" O; Aldea Alecrín 26°29'1.40" S -54° 8'13.26" O; Guavirá Poty: 26°38'52.26" S -54°14'36.76" O; Piñalito 26°31'22.81" S -53°55'26.47" O; Mado Delicia 26°14'26.15" S -54° 36'13.10" O). La determinación taxonómica fue realizada en base a caracteres morfológicos. Las muestras se encuentran depositadas en el Herbario del Laboratorio de Recursos Genéticos Vegetales "N. I. Vavilov", Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. El término "raza" se emplea aquí para referir a una entidad taxonómica delimitada por un conjunto de atributos morfológicos, mientras que el término "población" se emplea para referir a un conjunto de individuos que son cultivados por un agricultor o grupo familiar dado y que comparten características morfológicas similares, es decir, que se pueden asignar a la misma raza. En la Tabla 1 se indica la identificación de herbario, la raza de cada población muestreada, el sitio de procedencia, el número de individuos estudiados, y la nomenclatura informal adoptada en este trabajo.

Cada población fue designada con el número correspondiente de identificación de herbario. Las poblaciones recolectadas en la misma aldea, pertenecientes a la misma raza y para las que se disponía de un número bajo de individuos, se combinaron y nombraron con las iniciales de la raza correspondiente (es decir, bajo la denominación "BA" se reunieron los individuos pertenecientes a las 2 poblaciones de la raza Blanco angosto; "Co" reúne los individuos de 2 poblaciones de Colorado y "RoA y RoB" los de sendas poblaciones de Rosado).

**Tabla 1:** Razas nativas de maíces de la Provincia de Misiones.

Número de identificación de herbario	Población	Raza	Sitio de colección	N <sup>1</sup>
VAV6586	6586	Blanco ancho <sup>^</sup>	Aldea Alecrín, Dpto. Eldorado.	10
VAV6615	6615	Blanco ancho <sup>^</sup>	Aldea Guavirá Poty, Dpto. San Pedro.	16
VAV6602	6602	Blanco ancho <sup>^</sup>	Pozo Azul, Dpto. San Pedro.	15
VAV6599; VAV6587	BA	Blanco angosto <sup>^</sup>	Aldea Alecrín, Dpto. Eldorado.	30
VAV6610	6610	Blanco angosto <sup>^</sup>	Pozo Azul, Dpto. San Pedro.	20
VAV6592	6592	Tupí Blanco <sup>*</sup>	Pozo Azul, Dpto. San Pedro.	16
VAV6595	6595	Overo <sup>^</sup>	Aldea Alecrín, Dpto. Eldorado.	8
VAV6617	6617	Overo <sup>^</sup>	Aldea Guavirá Poty, Dpto. San Pedro.	10
VAV6601	6601	Overo <sup>^</sup>	Pozo Azul, Dpto. San Pedro.	16
VAV6594; VAV6589	Co	Colorado de Misiones <sup>*</sup>	Aldea Alecrín, Dpto. Eldorado.	20
VAV6604	6604	Colorado de Misiones <sup>*</sup>	Pozo Azul, Dpto. San Pedro.	12
VAV6597	6597	Azul de Misiones <sup>^</sup>	Aldea Alecrín, Dpto. Eldorado.	20
VAV6585	6585	Variiegado <sup>^</sup>	Aldea Alecrín, Dpto. Eldorado.	20
VAV6616; VAV6621	RoA	Rosado <sup>^</sup>	Aldea Guavirá Poty, Dpto. San Pedro.	20
VAV6603; VAV6602	RoB	Rosado <sup>^</sup>	Pozo Azul, Dpto. San Pedro.	20
VAV6593	6593	Amarillo angosto <sup>^</sup>	Aldea Alecrín, Dpto. Eldorado.	28
VAV6591	6591	Amarillo angosto <sup>^</sup>	Pozo Azul, Dpto. San Pedro.	16
VAV6611	6611	Amarillo ancho <sup>^</sup>	Pozo Azul, Dpto. San Pedro.	24
VAV6619	6619	Tupí amarillo <sup>*</sup>	Colonia Mado Delicia, Dpto. Eldorado.	16
VAV6608	6608	Tupí amarillo <sup>*</sup>	Piñalito, Dpto. San Pedro.	20
VAV6596	6596	Pipoca colorado <sup>*</sup>	Aldea Alecrín, Dpto. Eldorado.	20
VAV6618	6618	Pipoca colorado <sup>*</sup>	Aldea Alecrín, Dpto. Eldorado.	30
VAV6605	6605	Pipoca amarillo <sup>*</sup>	Piñalito, Dpto. San Pedro.	20
VAV6607	6607	Pororó azul <sup>*</sup>	Aldea Alecrín, Dpto. Eldorado.	25
VAV6614	6614	Pororó grande <sup>*</sup>	Aldea Guavirá Poty, Dpto. San Pedro.	20

<sup>\*</sup>maíces con granos de consistencia córnea, en adelante llamados "reventadores"; <sup>^</sup>maíces con granos de consistencia harinosa, en adelante llamados "harinosos"; <sup>\*</sup>maíces con granos de consistencia córnea en su periferia y harinosa en su interior, en adelante llamados "córneo-harinosos". <sup>1</sup>, número de individuos muestreados

La esterilización y germinación de los granos se realizó de acuerdo a lo detallado en Bracco *et al.* (5). El ADN genómico total se extrajo a partir de plántulas individuales de entre 5 a 7 cm de longitud, siguiendo el protocolo de Dellaporta *et al.* (6) con ligeras modificaciones (5).

Se analizaron 15 *loci* microsatélite nucleares independientes, abarcando todos los grupos de ligamiento del genoma del maíz (*bnlg1866*, *phi037*, *bnlg1018*, *bnlg1329*, *bnlg1108*, *bnlg1182*, *bnlg252*, *bnlg105*, *bnlg1287*, *bnlg1732*, *bnlg1740*, *bnlg1070*, *bnlg1209*, *bnlg1360*, *bnlg1526*). Las secuencias de los cebadores fueron

tomadas del MDB ([www.maizegdb.org](http://www.maizegdb.org)). Las reacciones de amplificación por PCR se efectuaron en un equipo GenePro, en un volumen final de 25  $\mu$ l, partiendo de 45 ng de ADN molde, *Buffer* 10X (Invitrogen) 1X, *Cl2Mg* (Invitrogen) 1,5 mM, *dNTPs* 200  $\mu$ M, 40 ng de cada cebador directo y reverso, *Taq* Polimerasa (Invitrogen) 1 unidad,  $H_2O$  bidestilada estéril. La separación de los productos de amplificación se efectuó mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida 6% (p/v), en condiciones desnaturalizantes como se detalla en Bracco *et al.* (5). La visualización de los fragmentos amplificados se realizó con el *kit Silver Sequence<sup>TM</sup> DNA Staining Reagents* (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los geles secos se digitalizaron utilizando un escaner convencional. La determinación de los tamaños alélicos se realizó por comparación con marcadores internos de tamaño conocido (7; 8) y con el marcador de peso molecular *30-330 AFLP<sup>®</sup> DNA Ladder* (Invitrogen).

### Análisis de los datos

Las frecuencias alélicas fueron calculadas por conteo directo a partir de los genotipos individuales, con el programa FSTAT versión 2.9.3.2 (9). La variabilidad genética se estimó utilizando los siguientes datos estadísticos: el número promedio de alelos por *locus* por población ( $A$ ), la riqueza alélica ( $R_s$ ), la heterocigosis media observada por *locus* ( $H_o$ ) y la heterocigosis media esperada por *locus* ( $H_e$ ). El número promedio de alelos por *locus* por población ( $A$ ) se obtuvo calculando la media aritmética del número de alelos presentes en cada uno de los *loci* analizados para cada población. Los estadísticos  $R_s$ ,  $H_o$  y  $H_e$  fueron calculados con el programa FSTAT. El ajuste a las proporciones de Hardy-Weinberg se evaluó para cada *locus* y cada población. Las estimas del índice de fijación  $F_{IS}$  (10) fueron obtenidas de acuerdo con Weir y Cockerham (11) utilizando el programa FSTAT. El nivel de significación se determinó mediante el *test* de permutaciones implementado en el mismo programa. La ocurrencia de alelos nulos fue evaluada utilizando el programa Micro-Checker versión 2.2.3 (12). El grado de diferenciación entre poblaciones se analizó por medio del índice de Fijación  $F_{ST}$  de Wright (10; 13) estimado a través del estadístico  $\theta$  según el método de análisis de la varianza propuesto por Weir y Cockerham (11). La significación de  $\theta$  se llevó a cabo mediante la permutación de los genotipos. En los casos donde se realizaron comparaciones múltiples, éstas fueron sometidas a la corrección de Bonferroni (14).

La partición de la variación genética dentro y entre las poblaciones fue evaluada mediante el análisis de la

varianza molecular (AMOVA; 15; 16) con el programa GeneALEX 6 (17). La significación estadística de cada componente de la varianza se evaluó en base a 999 permutaciones. Para este análisis se descartó el *locus bnlg1018* debido a que para la población 6614 posee 95% de datos faltantes. El análisis de correlación entre distancia genética y distancia geográfica se llevó a cabo a través del *test* de Mantel provisto por el subprograma ISOLDE del paquete GENEPOP versión 3.4 (18).

El análisis de agrupamiento poblacional se realizó aplicando la distancia genética de Reynolds *et al.* (19) a las frecuencias alélicas poblacionales, con el programa PowerMarker versión 3.25 (20). Se obtuvo un retículo de *Neighbor-Joining* (21) utilizando el mismo programa. Las medidas de soporte de grupos se obtuvieron mediante *bootstrapping* con 1000 pseudoréplicas, en el PowerMarker. El retículo fue visualizado con el programa Dendroscope (22).

El análisis de estructura poblacional bajo el enfoque Bayesiano se realizó utilizando el programa STRUCTURE (23). Se evaluaron valores de  $K$  (población ideal o acervo génico) entre 1 a 15 y 10 réplicas para cada valor de  $K$ , realizándose  $10^6$  iteraciones tras un período de *burn-in* de  $10^5$ . Todos los análisis fueron realizados bajo el modelo de frecuencias alélicas independientes, sin considerar información acerca del origen de cada individuo, así como tampoco el número de poblaciones incluidas. Además, se asumió que el genoma de cada individuo podía estar constituido por la contribución de una o más de las poblaciones inferidas (*admixture model*). La pertenencia de los individuos a una población ideal o acervo génico se determinó fijando un valor arbitrario del 60%. Para la selección del valor óptimo de  $K$  se tuvo en cuenta la corrida que mostró la mayor probabilidad posterior de los datos. Asimismo, los resultados de STRUCTURE fueron evaluados usando un criterio *ad-hoc* basado en la tasa de cambio del logaritmo de la probabilidad de los datos, entre los sucesivos valores de  $K$  ( $\Delta K$ ) (24).

### Resultados

El análisis de los 15 *loci* microsatélites evaluados permitió detectar un total de 192 alelos en 467 individuos de 25 poblaciones (15 razas nativas), siendo el número promedio de alelos por *locus* 12,8 (rango: 5-26). Los *loci* con los índices de variabilidad más altos fueron: *bnlg1866*, *bnlg1287*, *bnlg1209*, *bnlg1108*, *bnlg1070*, *bnlg1360*, *bnlg1108*, *bnlg1740* y *bnlg1526* (Tabla 2). Todos los *loci* evaluados evidenciaron una alta reproducibilidad. El total de datos faltantes fue de 4,2%.

**Tabla 2:** Variabilidad de loci microsatélite evaluados.

Locus	FAM <sup>a</sup>	Número de genotipos <sup>b</sup>	Número de observaciones	Número de alelos	H <sub>e</sub> <sup>c</sup>	H <sub>o</sub> <sup>d</sup>	PIC <sup>e</sup>
<i>bnlg1866</i>	0,224	70	457	19	0,859	0,569	0,844
<i>phi037</i>	0,649	23	455	8	0,542	0,310	0,510
<i>bnlg1182</i>	0,738	9	464	5	0,421	0,157	0,384
<i>bnlg252</i>	0,383	28	457	8	0,728	0,346	0,685
<i>bnlg1287</i>	0,305	22	459	9	0,759	0,521	0,717
<i>bnlg1732</i>	0,914	7	465	5	0,162	0,146	0,158
<i>bnlg1209</i>	0,293	45	463	12	0,840	0,523	0,823
<i>bnlg1018</i>	0,388	25	389	10	0,739	0,378	0,700
<i>bnlg1070</i>	0,317	73	452	20	0,838	0,442	0,823
<i>bnlg1360</i>	0,364	74	438	26	0,820	0,272	0,805
<i>bnlg105</i>	0,673	38	457	15	0,523	0,193	0,500
<i>bnlg1108</i>	0,371	48	438	18	0,779	0,427	0,751
<i>bnlg1329</i>	0,521	28	463	10	0,665	0,428	0,628
<i>bnlg1740</i>	0,241	33	408	14	0,835	0,233	0,815
<i>bnlg1526</i>	0,406	37	440	15	0,765	0,166	0,738
<b>Promedio</b>	<b>0,453</b>	<b>37,33</b>	<b>447</b>	<b>12,93</b>	<b>0,685</b>	<b>0,341</b>	<b>0,659</b>

<sup>a</sup> FAM: Frecuencia del alelo mayoritario; <sup>b</sup> número de genotipos distintos encontrados en la muestra; <sup>c</sup> H<sub>e</sub>: heterocigosis esperada; <sup>d</sup> H<sub>o</sub>: heterocigosis observada; <sup>e</sup> PIC: índice de polimorfismo (polymorphism information content). N= 467.

El rango calculado de alelos por *locus* por población (A) fue de 1,8 a 5,8; las poblaciones 6596 (Pipoca colorado) y RoB (Rosado) son las de menor y mayor número de alelos, respectivamente (Tabla 3). Las estimas de heterocigosis media observada (H<sub>o</sub>) oscilaron entre 0,179 y 0,450 (H<sub>o</sub> promedio: 0,348), mientras que la heterocigosis media esperada (H<sub>e</sub>) varió entre 0,226 y 0,687 (H<sub>e</sub> promedio: 0,523). Las poblaciones con el menor y mayor H<sub>o</sub> fueron 6614 (Pororó grande) y 6586 (Blanco ancho), mientras que las de menor y mayor H<sub>e</sub> son 6618 (Pipoca colorado) y RoB, respectivamente.

Los valores de R<sub>s</sub>, índice que tiene en cuenta las diferencias en los tamaños muestrales de las poblaciones, oscilaron entre 1,79 y 4,77 (R<sub>s</sub> promedio: 3,58), considerada en base a 8 individuos diploides, obteniéndose el menor valor para la población 6618 y el mayor valor para la población RoB (Tabla 3). De acuerdo a lo indicado, los índices A, H<sub>e</sub> y R<sub>s</sub> describen a la población RoB como la de mayor variabilidad, mientras que la población 6614 es la menos diversa.

Considerando aquellos alelos presentes sólo en una de las poblaciones y ausentes en las restantes, se contabilizaron 41 alelos exclusivos. La población con mayor número de alelos exclusivos es la 6608 (con 5 alelos), seguida en orden decreciente de abundancia por las poblaciones 6605, RoB, 6592, RoA, 6593, 6611, 6619, 6614, BA, Co, 6585, 6610, 6595, 6617 y 6601. Las poblaciones restantes no presentaron este tipo de alelos.

**Tabla 3:** Diversidad genética de las razas nativas de maíz de Misiones.

Raza/ Población	A	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	R <sub>s</sub>	F <sub>IS</sub> global
Blanco ancho/ 6586	4,13	0,450+0,331	0,548+0,302	3,89	0,179*
Blanco ancho/ 6615	3,40	0,276+0,273	0,477+0,279	2,97	0,421*
Blanco ancho/ 6602	3,93	0,333+0,218	0,563+0,313	3,62	0,408*
Blanco angosto/ BA	5,27	0,366+0,242	0,562+0,295	4,02	0,348*
Blanco angosto/ 6610	5,13	0,353+0,261	0,599+0,256	4,07	0,411*
Tupí blanco/ 6592	3,93	0,341+0,265	0,534+0,293	3,44	0,362*
Overo/ 6595	3,80	0,413+0,280	0,616+0,232	3,93	0,329*
Overo/ 6617	4,13	0,427+0,245	0,588+0,246	3,87	0,273*
Overo/ 6601	4,73	0,348+0,241	0,622+0,273	4,19	0,441*
Colorado de Misiones/ Co	4,87	0,375+0,191	0,609+0,234	3,98	0,383*
Colorado de Misiones/ 6604	4,73	0,413+0,225	0,600+0,229	4,25	0,312*
Azul de Misiones/ 6597	3,73	0,331+0,282	0,459+0,267	3,15	0,279*
Variegado/ 6585	4,67	0,283+0,208	0,546+0,286	3,77	0,482*
Rosado/ RoA	5,47	0,384+0,226	0,618+0,230	4,33	0,384*
Rosado/ RoB	5,80	0,431+0,249	0,687+0,205	4,77	0,373*
Amarillo angosto/ 6593	5,40	0,445+0,174	0,614+0,176	4,08	0,275*
Amarillo angosto/ 6591	3,60	0,325+0,201	0,528+0,219	3,26	0,386*
Amarillo ancho/ 6611	5,00	0,411+0,185	0,625+0,212	4,22	0,343*
Tupí amarillo/ 6619	5,00	0,403+0,156	0,552+0,236	4,14	0,269*
Tupí amarillo/ 6608	5,47	0,413+0,224	0,642+0,195	4,63	0,357*
Pipoca colorado/ 6596	1,80	0,243+0,280	0,245+0,269	1,82	0,008
Pipoca colorado/ 6618	2,07	0,188+0,253	0,226+0,225	1,79	0,271*
Pipoca amarillo/ 6605	3,40	0,311+0,203	0,427+0,223	2,92	0,166*
Pororó grande/ 6614	2,40	0,179+0,254	0,266+0,271	2,08	0,278*
Pororó azul/ 6607	2,80	0,260+0,244	0,322+0,258	2,25	0,192*

A: número promedio de alelos por *locus* por población; H<sub>e</sub>: heterocigosis observada promedio; H<sub>o</sub>: heterocigosis esperada promedio; R<sub>s</sub>: riqueza alélica promedio (calculada en base a 8 individuos). \*p<0,05. Significación establecida mediante el método de permutaciones.

De las 25 poblaciones analizadas, únicamente la población 6596 exhibió ajuste a las proporciones de Hardy-Weinberg en el análisis de *locus* individuales y en el de estimas globales del índice F<sub>IS</sub> (Tabla 3). Para las poblaciones restantes se obtuvieron valores de F<sub>IS</sub> globales positivos y significativos, indicando un exceso de homocigotas con respecto a lo esperado bajo la hipótesis de unión al azar de las gametas. Por el contrario, no se observó exceso de heterocigotas en ninguna de las poblaciones ni *loci* analizados. Todos los *loci* presentaron un exceso de homocigotas compatible con la presencia de alelos nulos en al menos una población (datos no mostrados), sin embargo el patrón de distribución hallado es también coincidente con lo esperado en sistemas endogámicos.

El análisis de la estructura poblacional, realizado mediante el índice de fijación F<sub>ST</sub> de Wright (10, 13), arrojó una estima global del índice F<sub>ST</sub> de 0,266 (I.C.95%=0,237–0,298; I.C.99%=0,229–0,309) indicando un alto grado de diferenciación entre las poblaciones. La variación entre poblaciones constituye el 26,6% de la variación total, mientras que 73,4% corresponde a la variación dentro de las poblaciones. El 67,3% de las comparaciones entre pares de poblaciones resultaron ser altamente significativas (tabla suplementaria 1). Los valores de diferenciación más altos corresponden al par de poblaciones 6595-6618, pertenecientes a las razas Overo y Pipoca colorado; mientras que el par de poblaciones menos diferenciadas es 6610-6602, correspondiente a las razas Blanco angosto

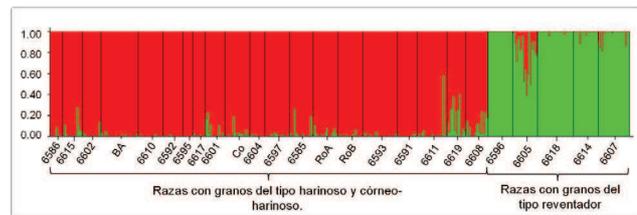
y Blanco ancho, respectivamente. Cabe destacar que las razas con granos del tipo reventador presentan los valores de diferenciación más altos.

La distancia media entre todos los pares de poblaciones fue de 0,280 (tabla suplementaria 1). El valor mínimo de distancia hallado fue para el par de poblaciones 6610–6602 ( $D=0,088$ ) de las razas Blanco angosto y Blanco ancho, respectivamente; mientras que el par de poblaciones con la mayor distancia genética fue 6614–6618 ( $D=0,608$ ) de las razas Pororó grande y Pipoca colorado, respectivamente.

El análisis de correlación entre diferenciación genética ( $F_{ST}/1 - F_{ST}$ ) y distancias geográficas (ln distancias entre aldeas, en kilómetros) indicó ausencia de asociación entre estas variables (test de Mantel,  $r=0,2$ ,  $p>0,05$ ).

Para evaluar el efecto del sitio de colección y de la asignación racial en la distribución de la variación genética se realizó un AMOVA considerando en primer lugar, a las aldeas de las comunidades guaraníes como el nivel jerárquico más alto, y posteriormente, a la identificación racial. El primer análisis reveló que el 68% ( $\phi=0,32$ ;  $p<0,001$ ) de la variación genética reside dentro de las poblaciones, el 29% ( $\phi=0,296$ ;  $p<0,001$ ) entre las poblaciones de cada aldea, mientras que sólo el 3% ( $\phi=0,035$ ;  $p<0,001$ ) de la variación radica entre las aldeas. Cuando se tomaron las razas como el nivel jerárquico más alto, el análisis reveló, que el 68% ( $\phi=0,318$ ;  $p<0,001$ ) de la variabilidad genética reside dentro de las poblaciones, mientras que el 13% ( $\phi=0,162$ ;  $p<0,001$ ) entre las poblaciones dentro de las razas y el 19% ( $\phi=0,186$ ;  $p<0,001$ ) de la variación entre las razas.

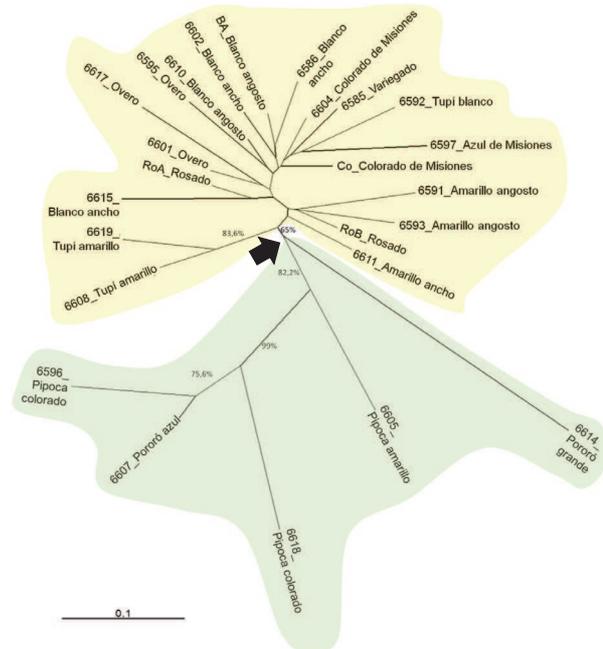
En el análisis de la estructura poblacional mediante el método Bayesiano, la selección del número de poblaciones ideales ( $K$ ) no pudo establecerse en forma inequívoca mediante el criterio propuesto por Pritchard *et al.* (23). Sin embargo, la evaluación de  $K$  siguiendo el desarrollo de Evanno *et al.* (24) permitió identificar a  $K=2$  como el valor óptimo. Para dicho valor de  $K$ , los individuos se agruparon de acuerdo a la consistencia del grano: por un lado reventadores y, por el otro, harinosos y córneo-harinosos (Figura 1). El promedio de los coeficientes de pertenencia de los individuos a cada grupo fue superior al 92%, con excepción de la población 6619 que presentó un coeficiente de pertenencia promedio del 85% y de la población 6605 cuyo valor fue de 79,33%, con un 20% de sus individuos asignados a otro acervo génico. En general, las poblaciones de las razas del tipo reventador, excepto 6605, fueron altamente homogéneas a lo largo de los sucesivos  $K$  analizados, presentando un coeficiente de pertenencia a su grupo superior al 97%.



**Figura 1:** Análisis Bayesiano de la estructura poblacional en razas de maíz de Misiones.

Cada individuo está representado por una línea vertical coloreada; los colores indican la contribución de cada una de las poblaciones inferidas ( $K$ ) en la constitución de los genomas individuales. Las líneas negras delimitan las poblaciones de origen.

El retículo de *Neighbor-Joining* de la Figura 2 muestra dos grandes particiones: las poblaciones de maíces con granos de tipo reventador y las poblaciones de razas con granos harinosos y córneo-harinosos (65% de apoyo). Sin embargo, dentro de estos agrupamientos no se reconoce un patrón de relaciones claro entre las poblaciones analizadas. Se destaca la longitud de las ramas dentro del agrupamiento formado por los maíces reventadores.



**Figura 2:** Retículo de *Neighbor-Joining* obtenido en base a la distancia genética de Reynolds *et al.* (19). Los números sobre las ramas indican los valores de apoyo de grupos (*bootstrapping* con 1000 pseudoréplicas). La flecha negra indica las dos grandes particiones discutidas en el texto. El sombreado amarillo abarca a las razas harinosas y córneo-harinosas y el sombreado verde a las razas reventadoras.

A partir de los resultados obtenidos en el análisis de agrupamiento, se realizó un AMOVA considerando como nivel jerárquico más alto los dos grandes grupos de razas, es decir, razas con granos del tipo harinoso y córneo-harinoso vs. razas con granos del tipo reventador. Este análisis reveló que el 61% de la variación reside dentro de

las poblaciones, mientras que el 20% entre las poblaciones dentro de cada grupo de razas y el 19% de la variación se debe a diferencias entre ambos grupos de razas.

## Discusión

En el presente trabajo se estudiaron las razas nativas de maíz cultivadas por comunidades aborígenes de la etnia Guaraní que habitan la provincia de Misiones. Allí, las razas nativas de maíz se cultivan bajo la influencia de la selección humana, del medio ambiente, del flujo genético y de la deriva genética, los cuales interactúan determinando diferentes patrones de diversidad genética. Los resultados presentados aquí constituyen una contribución original ya que el análisis se realizó a una escala microgeográfica, lo cual permite cuantificar la diversidad genética y evaluar la estructura intra e inter poblacional de las razas nativas de maíz.

En conjunto, los materiales estudiados poseen altos niveles de variabilidad microsatélite. El promedio de alelos por *locus* obtenido (12,93) está dentro del rango informado para razas nativas de México (7,84–14,9; 25; 26) y para los grupos andinos y del norte de EE.UU. delimitados por Vigouroux *et al.* (26) (12,4 y 10,6, respectivamente). Por otra parte, los valores obtenidos son marcadamente superiores a los calculados por Matsuoka *et al.* (27) para razas nativas de México y Venezuela (5,6) y para un conjunto de 94 líneas de elite de EE.UU. (5,2; 28). También superaron ampliamente los valores hallados para líneas de maíz de regiones tropicales y subtropicales del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) (7,2–7,4; 29, 30).

Al considerar las poblaciones de acuerdo a la consistencia del grano, los niveles de diversidad genética detectados en las poblaciones de maíces reventadores (córneos) fueron la mitad de los obtenidos para las poblaciones de maíces harinosos y córneo-harinosos. Estas discrepancias podrían ser consecuencia de una tasa de erosión genética diferencial, con cuellos de botella más severos o regímenes selectivos más estrictos para las poblaciones de maíces reventadores debido a las preferencias de los agricultores y/o a condiciones ambientales adversas. Alternativamente, los maíces reventadores podrían haber tenido niveles ancestrales de variabilidad limitados en comparación con los de las poblaciones de maíces harinosos y córneo-harinosos.

A nivel de poblaciones individuales, los valores obtenidos de  $A$  y  $H_c$  fueron similares a los valores calculados para los diferentes complejos raciales de germoplasma de maíz tropical, subtropical y templado del CIMMYT ( $A$ : 3,76;  $H_c$ : 0,52; 31) y de entradas de razas de maíz mexicanas ( $A$ : 3,44,  $H_c$ : 0,48; 25). La diversidad genética promedio de las poblaciones aquí estudiadas representó el 75% de la diversidad de poblaciones de razas nativas de maíz coleccionadas directamente en los campos de agricultores tradicionales de los Valles Centrales de Oaxaca, México

( $H_c$ : 0,650–0,720; 32). Esto concuerda con lo esperado para poblaciones provenientes de las áreas centrales de la distribución. El valor promedio de  $H_c$  hallado en el presente estudio equivale al 74% del valor obtenido para las razas nativas de las regiones andina ( $H_c$ : 0,706) y norte de EE.UU. ( $H_c$ : 0,718) y al 65% del calculado para las regiones altas de México y bajas tropicales, delimitadas por Vigouroux *et al.* (26). Sin embargo, las estimaciones regionales de Vigouroux *et al.* (26) se basan en un espectro geográfico mucho más amplio, y con una estrategia de muestreo focalizada en la detección de la máxima variabilidad genética. Considerando el área geográfica estudiada y el número comparativamente pequeño de razas analizadas, las razas nativas de Misiones presentaron altos niveles de diversidad genética. Los resultados obtenidos manifiestan la importancia de los maíces de Misiones como fuente de diversidad alélica, avalando su empleo en la generación de nuevos materiales para ser comercializados en la Argentina. Por esto, se destaca la necesidad de conservación (*in-situ* y *ex-situ*) de este recurso genético esencial para las comunidades aborígenes y para el resto de la humanidad.

El maíz es un cultivo anual anemófilo, considerado de fecundación predominantemente cruzada. Sin embargo, un alto porcentaje de las poblaciones (95%) no ajustaron a Hardy-Weinberg, exhibiendo exceso de homocigotas. Aunque en contradicción con las expectativas teóricas, la falta de ajuste ha sido también informada en diversos estudios poblacionales de maíces de diferentes orígenes (7; 31; 32; 33; 34; 35). El exceso de homocigotas en especies alógamas puede ser atribuido a diferentes causas, como por ejemplo errores experimentales, existencia de alelos nulos, apareamiento preferencial, selección, subestructuración poblacional, endogamia debido al manejo de las semillas por parte de los agricultores y cuellos de botella severos. Si bien las poblaciones aquí estudiadas mostraron un exceso de homocigotas compatible con la existencia de alelos nulos para distintos *loci*, sólo una moderada proporción de los desvíos observados pueden ser adjudicados a este fenómeno, siendo la causa más probable de los mismos la endogamia generada por las prácticas de los cultivadores locales, quienes influyen directamente en la distribución de la diversidad genética y en los niveles de flujo génico. Al igual que lo observado para las estimas de diversidad, la distribución de la variabilidad también parecería ser diferente entre los grupos de razas harinosas y córneo-harinosas vs. razas reventadoras. El  $F_{ST}$  promedio entre razas de reventadores ( $F_{ST}$ : 0,397) resultó ser el doble que el obtenido para las razas harinosas y córneo-harinosas ( $F_{ST}$ : 0,16), enfatizando la particularidad de los maíces reventadores. Estas observaciones, junto a los menores niveles de variabilidad, permiten sugerir que la deriva genética estaría jugando un papel fundamental en la conformación de la estructura genética de las poblaciones de maíces con granos del tipo reventador.

Las poblaciones de maíz están sujetas a procesos de

deriva, migración y a la selección, tanto natural como artificial. Para tener una idea de cómo evoluciona este sistema, es importante estudiar en detalle la dinámica poblacional directamente en los campos de los cultivadores y el impacto de sus prácticas en la determinación de la estructura y diversidad poblacional. Al mismo tiempo, la biología del maíz juega un rol muy importante en la estructuración de las poblaciones. Las costumbres de las comunidades Guaraníes de sembrar las diferentes razas nativas en campos pequeños y muy cercanos, debería tener como consecuencia un flujo génico intenso entre las razas. Sin embargo, los altos niveles de diferenciación encontrados entre las poblaciones, sugieren la existencia de barreras, tanto naturales como artificiales, que imposibilitan el flujo génico. Esto es más evidente entre las razas de maíces reventadores que exhiben una mayor estructuración. La diferenciación de las razas autóctonas en general se puede explicar por dos causas no mutuamente excluyentes. Primero, la existencia de barreras biológicas como la ocurrencia de diferencias en el tiempo de floración, o cualquier tipo de incompatibilidad aún no identificada, que lleven a la reducción del flujo génico. En segundo lugar, la selección ejercida por el agricultor sobre determinadas combinaciones de rasgos morfológicos, puede estar preservando la identidad de las razas nativas cultivadas en Misiones.

En cuanto a la distribución de la diversidad genética en las diferentes poblaciones de maíz, el sitio de colección (es decir, la aldea de origen) tiene una escasa influencia. Esto puede deberse al manejo de los cultivadores que cada año suelen intercambiar semillas con cultivadores de otras aldeas luego de la cosecha. La variación entre razas es similar a la variación dentro de las razas, poniendo de manifiesto la falta de relación directa entre la similitud genética y la morfológica. El análisis Bayesiano de la estructura poblacional y el análisis de agrupamiento mediante el método de *Neighbor-Joining* concordaron en detectar dos acervos génicos en las poblaciones de Misiones. El primer grupo está conformado por razas con granos del tipo reventador y el segundo por razas con granos del tipo harinoso y córneo-harinoso. Esto, junto con los niveles significativos de diferenciación detectados entre ambos grupos de razas, corrobora la existencia de barreras al flujo génico de origen biológico y/o antrópico, en particular para las razas de reventadores.

Los resultados presentados serán de utilidad para el diseño de estrategias que permitan optimizar el uso y la conservación de este germoplasma autóctono. Los programas de conservación deberán priorizar la preservación de los dos grandes grupos de razas nativas de Misiones, es decir los maíces reventadores y los harinosos y córneo-harinosos, como dos unidades de manejo diferentes.

## Conclusiones

**I.** Las razas nativas de Misiones constituyen una reserva de diversidad significativa, con potencial para ampliar la base genética de los programas de fitomejoramiento.

**II.** Las razas de Misiones se encuentran constituidas por dos acervos génicos diferentes, que concuerdan con el tipo de grano que poseen, es decir, harinosos/córneo-harinosos y reventadores. Estos deberían ser considerados como unidades de conservación independientes.

## Agradecimientos

A las comunidades Guaraníes por cedernos las razas nativas de maíz. A los subsidios otorgados por el CONICET (PIP 0342) y la Universidad de Buenos Aires (20020100100859). Este trabajo forma parte de la Tesis Doctoral de la Dra. M. Bracco.

## Referencias

1. **Cámara Hernández, J.; Miente Alzogaray, A.M.; Bellón R. y Galmari, A.J.**, Razas de maíz nativas de la Argentina. Ed. Fac. Agronomía, UBA, vol. 1, 174 pp. 2012.
2. **Martínez-Crovetto, R.**, La alimentación entre los indios guaraníes de Misiones (República Argentina). *Etnobiológica*, 4: 1–24. 1968.
3. **Fontana, J.L.**, Folia botánica ET geobotánica correntesiana. Publicaciones del Herbarium Humboldtianum, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste. Capítulo 19. 2005.
4. **Viglizzo, E.F.; Ricard, M.F.; Jobbágy, E.G.; Frank, F.C. y Carreño, L.V.**, Assessing the cross-scale impact of 50 years of agricultural transformation in Argentina. *Field Crops Research*, 124. 186–194. 2011.
5. **Bracco, M.; Lia, V.V.; Cámara Hernández, J.A.; Poggio, L. y Gottlieb, A.M.**, Genetic diversity of maize landraces from lowland and highland agro-ecosystems of Southern South America: implications for the conservation of native resources. *Ann. Appl. Biol.*, 160: 308–321. 2012.
6. **Dellaporta, I.K.; Wood, J. y Hicks, J.B.**, A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1: 19–21. 1983.
7. **Lia, V.V.**, Diversidad genética y estructura poblacional en razas nativas de maíz (*Zea mays* ssp. *mays*) del Noroeste Argentino: presente y pasado del germoplasma autóctono. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. 193 pp. 2004.
8. **Bracco, M.**, Variabilidad microsatélite en maíces reventadores autóctonos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. 2006.
9. **Goudet, J.**, **FSTAT**, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). URL <http://www2.unil.ch/popgen/>. 2001.
10. **Wright, S.**, The interpretation of population structure by F-

- statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19: 395-420. 1965.
11. **Weir, B. y Cockerham, C.C.**, Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370. 1984.
  12. **van Oosterhout, C.; Hutchinson, W.F.; Wills, D.P.M.; Shipley, P.**, Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-538. 2004.
  13. **Wright, S.**, Variability within and among natural populations in *Evolution and the Genetics of Populations*. Chicago, IL, USA: University of Chicago Press. 290 pp. 1978.
  14. **Rice, W.**, Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225. 1983.
  15. **Excoffier, L.; Smouse, P. y Quattro, J.**, Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491. 1992.
  16. **Excoffier, L.**, Analysis of population subdivision. In: *Handbook of Statistical Genetics*, 3rd Edn. D. Balding M & Bishop C (eds.). Wiley. New York, USA pp. 980-1020. 2007.
  17. **Peakall, R. y Smouse, P.E.**, GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295. 2006.
  18. **Raymond, M. y Rousset, F.**, Genepop (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered*, 86:248-249. 1995.
  19. **Reynolds, J.; Weir, B.S. y Cockerham C.C.**, Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105: 767-779. 1983.
  20. **Liu, K. y Muse, S.V.**, PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21: 2128-2129. 2005.
  21. **Saitou, N. y Nei, M.**, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425. 1987.
  22. **Huson, D.H. y Bryant, D.**, Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 254-267. 2006.
  23. **Pritchard, J.K.; Stephens, M. y Donnelly, P.**, Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959. 2000.
  24. **Evanno, G.; Regnaut, S. y Goudet, J.**, Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620. 2005.
  25. **Reif, J.C.; Warburton, M.L.; Xia, X.C.; Hoisington, D.A.; Crossa, J.; Taba, S.; Muminovic, J.; Bohn, M.; Frisch, M. y Melchinger, A.E.**, Grouping of accessions of Mexican races of maize revisited with SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 113, 177-185. 2006.
  26. **Vigouroux, Y.; Glaubitz, J.C.; Matsuoka, Y.; Goodman, M.M.; Sánchez G., J. y Doebley, J.F.**, Population structure and genetic diversity of new world maize races assessed by DNA microsatellites. *Amer. J. Bot.*, 95: 1240-1253. 2008.
  27. **Matsuoka, Y.; Mitchell, S.E.; Kresovich, S.; Goodman, M.M. y Doebley, J.F.**, Microsatellites in *Zea* - variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 436-450. 2002.
  28. **Senior, M.L.; Murphy, J.P., Goodman, M.M. y Stuber, C.W.**, Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. *Crop Science*, 38: 1088-1098. 1998.
  29. **Xia, X.C.; Reif, J.C.; Hoisington, D.A.; Melchinger, A.E.; Frisch, M. y Warburton, M.L.**, Genetic diversity among CIMMYT maize inbred lines investigated with SSR markers: I. Lowland tropical maize. *Crop Science*, 44:2230-2237. 2004.
  30. **Xia, X.C.; Reif, J.C.; Melchinger, A.E.; Frisch, M.; Hoisington, D.A.; Beck, D.; Pixley, K. y Warburton, M.L.**, Genetic diversity among CIMMYT maize inbred lines investigated with SSR markers: II. Subtropical, tropical midaltitude, and highland maize inbred lines and their relationships with elite U.S. and European maize. *Crop Science*, 45:2573-2582. 2005.
  31. **Reif, J.C.; Xia, X.C.; Melchinger, A.E.; Warburton, M.L.; Hoisington, D.A.; Beck, D.; Bohn, M. y Frisch, M.**, Genetic diversity determined within and among CIMMYT maize populations of tropical, subtropical, and temperate germplasm by SSR markers. *Crop Science*, 44, 326-334. 2004.
  32. **Pressoir, G. y Berthaud, J.**, Patterns of population structure in maize landraces from the Central Valleys of Oaxaca in Mexico. *Heredity*, 92:88-94. 2004.
  33. **Kahler, A.L.; Hallauer, A.R. y Gardner, C.**, Allozyme polymorphism within and among open-pollinated and adapted exotic populations of maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 72: 592-601. 1986.
  34. **Dubreuil, P. y Charcosset, A.**, Genetic diversity within and among maize populations: a comparison between isozyme and nuclear RFLP loci. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 577-587. 1998.
  35. **Lia, V.V.; Poggio, L. y Confalonieri, V.A.**, Microsatellite variation in maize landraces from Northwestern Argentina: genetic diversity, population structure and racial affiliations. *Theoretical and Applied Genetic*, 119: 1053-1067. 2009.

Recibido: 12/12/2012

Aprobado: 13/04/2013

- Mariana Bracco  
Licenciada en Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires. Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas. Becaria Posdoctoral ANPCyT. mbracco@ege.fcen.uba.ar
- Verónica V. Lia  
Licenciada en Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires (UBA). Doctora en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN), Universidad de Buenos Aires (FCEN). Investigadora Adjunta Carrera del Investigador Científico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CIC - CONICET). Jefe de trabajos Prácticos, re-

gular, FCEN-UBA. Categoría III en el Sistema de Incentivos a los Docentes–Investigadores. [vlia@cniia.inta.gov.ar](mailto:vlia@cniia.inta.gov.ar)

- Lidia Poggio

Licenciada en Ciencias Biológicas, FCEN, UBA. Doctora en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN), Universidad de Buenos Aires (UBA). Investigador Superior Carrera del Investigador Científico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CIC - CONICET). Profesora Consulta FCEN-UBA. [lidialidgia@yahoo.com.ar](mailto:lidialidgia@yahoo.com.ar)

- Julián Alberto Cámara Hernández

Ingeniero Agrónomo, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Profesor Titular Consulto Exclusivo de la cátedra de Botánica Agrícola, en el Departamento de Ecología, de la Facultad de Agronomía (Universidad de Buenos Aires), desde 1998 al presente. [jcamara@agro.uba.ar](mailto:jcamara@agro.uba.ar)

- Alexandra Marina Gottlieb

Licenciada en Ciencias Biológicas, FCEN, UBA, año 1992. Doctora en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN), Universidad de Buenos Aires (UBA), año 1997. Investigadora Adjunta Carrera del Investigador Científico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CIC - CONICET). Jefe de trabajos Prácticos, regular, FCEN-UBA. Categoría IV en el Sistema de Incentivos a los Docentes–Investigadores. [gottlieb@ege.fcen.uba.ar](mailto:gottlieb@ege.fcen.uba.ar)