

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DEL
GERMOPLASMA DE MAÍZ BLANCO DENTADO DE
URUGUAY MEDIANTE MICROSATÉLITES**

por

María Bettina PORTA UMPIÉRREZ

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magíster en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Vegetales

MONTEVIDEO

URUGUAY

Noviembre 2016

Tesis aprobada por el tribunal integrado por PhD. Rubens Nodari, PhD. Ing Agr. Clara Pritsch, PhD. Jorge Franco y PhD. Ing. Agr. Federico Condón el 15 de diciembre de 2016

Autora: Lic. en Ciencias Biológicas Ma. Bettina Porta Umpiérrez.

Director: Ing. Agr. PhD. Guillermo Alesio Galván Vivero,

Co-director: Ing. Agr. PhD. Rafael Vidal André.

AGRADECIMIENTOS

Al culminar esta etapa quiero agradecer a mi tutor Guillermo Galván su orientación, seguimiento y apoyo sostenido durante el trabajo y junto con mi co-orientador Rafael Vidal les agradezco la confianza brindada para enfrentar grandes desafíos. También quiero agradecer a todos los integrantes del comité de seguimiento: Federico Condón, Victoria Bonnacarrere y Jorge Franco quienes hicieron valiosos aportes y proporcionaron herramientas de vital importancia para el desarrollo de este trabajo. También quiero agradecer a Lucía Gutiérrez quien fue parte de la discusión inicial del trabajo y a Mercedes Rivas por los aportes teóricos y logísticos brindados.

Por su parte, también agradezco profundamente a Marylin Warburton, Claudia Bedoya y Orlando Noldín toda su buena disponibilidad para responder a mis consultas técnicas y los aportes conceptuales que me brindaron. Agradezco a todos los integrantes del tribunal de tesis: Rubens Nodari, Clara Pritsch, Jorge Franco y Federico Condón la buena disponibilidad que tuvieron en todo momento y las enriquecedoras sugerencias finales que realizaron.

Quiero agradecer a mis compañeras de laboratorio Wanda Iriarte y Sara Murchio Vignolo quienes estuvieron siempre poniendo lo mejor con total disposición para responderme dudas, entrenarme y cooperar en cada momento que lo necesite. Así como también quiero agradecer a Manuela Guimaraens y Natalia Curbelo, compañeras del trabajo de campo, que cooperaron enormemente en la evaluación fenotípica realizada.

Por último quiero agradecer profundamente a todos mis seres queridos por todo el apoyo incondicional y cariño que me brindaron dándome las fuerzas necesarias para que este trabajo resultara posible.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	VII
SUMMARY	VIII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. LAS VARIEDADES CRIOLLAS	1
1.1.1. <u>Conceptos generales</u>	1
1.1.2. <u>Las variedades criollas en Uruguay</u>	4
1.2. EL MAÍZ CULTIVADO (<i>Zea mays L. spp. mays</i>)	6
1.2.1. <u>Generalidades</u>	6
1.2.2. <u>Origen del maíz cultivado (<i>Zea mays L. spp. mays</i>) y rutas de dispersión en América</u>	6
1.2.3. <u>Diversidad racial del maíz cultivado en América</u>	9
1.3. EL MAÍZ CULTIVADO EN URUGUAY	10
1.3.1. <u>Conservación <i>in situ</i> del maíz en Uruguay</u>	10
1.3.2. <u>Conservación <i>ex situ</i> del maíz en Uruguay</u>	12
1.3.3. <u>La Raza de maíz Blanco Dentado en Uruguay</u>	14
1.4. LAS COLECCIONES NÚCLEO	17
1.4.1. <u>Generalidades</u>	17
1.4.2. <u>Colección núcleo de maíz de Uruguay</u>	17
1.4.3. <u>Colección núcleo de la raza Blanco Dentado uruguaya</u>	19
1.5. ESTRUCTURA GENÉTICA DE UNA COLECCIÓN	21
1.5.1 <u>Significancia para el mejoramiento genético</u>	21

1.5.2 <u>Herramientas para la caracterización de las colecciones</u>	22
1.5.2.1. Los microsatélites en estudios de diversidad y estructura genética de variedades criollas de maíz.....	23
1.5.2.2. El método de bulk DNA fingerprinting en variedades criollas de maíz.....	26
1.6. REGENERACIÓN DE ACCESIONES DE MAÍZ EN COLECCIONES <i>EX SITU</i>	27
1.7. OBJETIVOS	29
1.7.1 <u>Objetivo general</u>	29
1.7.2 <u>Objetivos específicos</u>	29
1.8. PREGUNTAS DE LA INVESTIGACIÓN	30
2. <u>GENETIC DIVERSITY AND STRUCTURE IN THE URUGUAYAN WHITE DENT MAIZE GERMPLASM USING MICROSATELLITES (SSR) MARKERS</u>	33
2.1 ABSTRACT	33
2.2 INTRODUCTION	34
2.3 MATERIALS AND METHODS	37
2.3.1. <u>Plant material</u>	37
2.3.2. <u>DNA isolation in bulks</u>	37
2.3.3. <u>SSR markers, amplifications and fragments analysis</u>	38
2.3.4. <u>Genetic diversity and population structure</u>	39
2.3.5. <u>Genetic structure and association with phenotypic data and geographic origin</u>	41
2.3.6. <u>Core collection representativeness</u>	42

2.3.7. <u>Comparing original accessions and regenerations</u>	42
2.4 RESULTS	43
2.4.1. <u>Genetic diversity</u>	43
2.4.2. <u>Genetic structure of the collection</u>	45
2.4.3. <u>Genetic structure and association with phenotypic data and geographical origin</u>	47
2.4.4. <u>Representativeness of the core collection</u>	49
2.4.5. <u>Identity between original and regenerated accessions</u>	52
2.5 DISCUSSION	54
2.5.1. <u>Genetic diversity in the White Dent collection</u>	55
2.5.1.1. Diversity within accessions.....	56
2.5.1.2. Diversity among accessions.....	57
2.5.2. <u>Genetic structure of the collection</u>	57
2.5.3. <u>Representativeness of the core collection</u>	60
2.5.4. <u>Genetic integrity of regenerated accessions</u>	62
2.6 ACKNOWLEDGEMENTS	64
2.7 REFERENCES	64
3. <u>DISCUSIÓN GENERAL</u>	75
4. <u>CONCLUSIONES</u>	79
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	80
6. <u>ANEXOS</u>	100
6.1 SUPPLEMENTAL MATERIAL	100

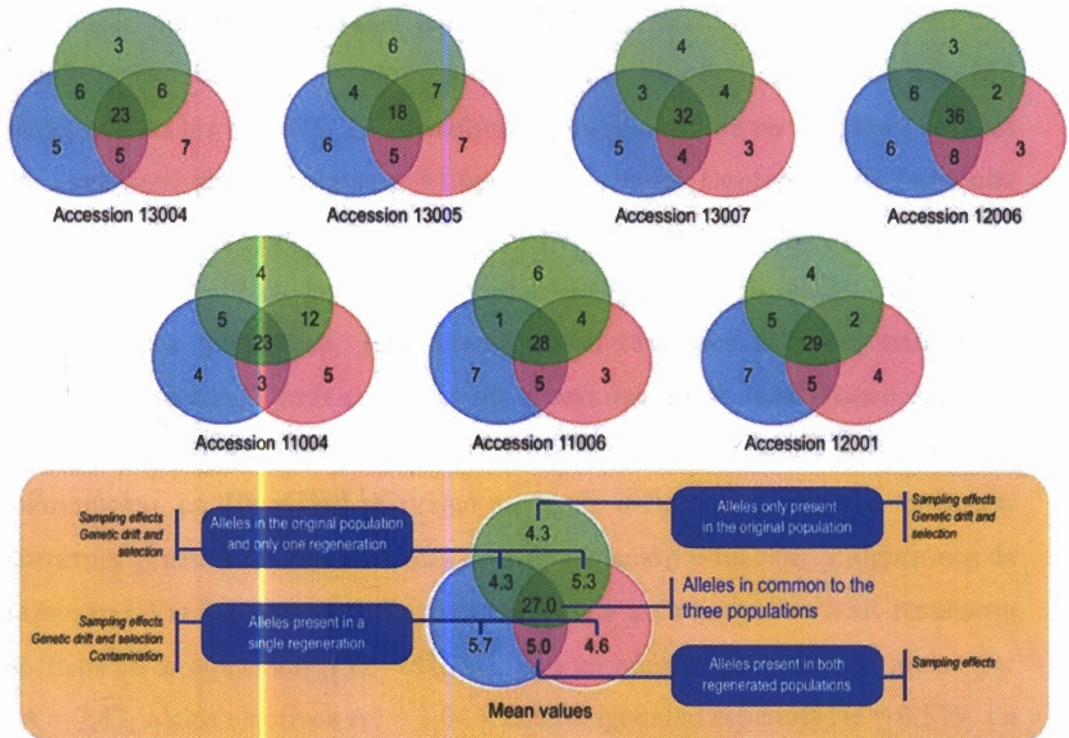


Fig 7 The number of alleles from 12 simple sequence repeat (SSR) markers shared by the original accessions (green circle on top) and the corresponding regenerations in Mexico (red, bottom right) and in Uruguay (blue, bottom left), shared by two of the three populations, and unique alleles for the original population, Mexico or Uruguay, with lists of the putative causes under each situation.

2.5 DISCUSSION

Landraces are defined as distinct populations that evolved under the influence of geographical or ecological conditions, such as climate, soil and crop management (Cömertpay et al. 2011). Landraces are diverse in their genetic composition between populations as well as within populations (Brown 1978; Angioi et al. 2011). In allogamous species the majority of the diversity is found within accessions or populations, and to a less extent between them (Hamrik and Godt 1996; Monteverde

RESUMEN

Uruguay posee una gran diversidad genética local de maíz (*Zea mays* L.) en uso, conservada *in situ*, así como *ex situ*. La colección *ex situ* está constituida por 852 accesiones colectadas en 1978. La colección *ex situ* se clasifica en diez tipos raciales definidos por caracteres fenotípicos. El tipo racial Blanco Dentado es de particular interés debido a su alta producción de biomasa para forraje o ensilado, está integrado por 90 accesiones y 17 de las mismas conforman la colección núcleo definida en base a caracteres fenotípicos. Esta investigación tuvo por objetivo estudiar la diversidad y estructura genética de las 90 accesiones de la raza Blanco Dentado (RBD) utilizando 26 marcadores SSR, así como la representatividad genética de su colección núcleo. La diversidad se evaluó mediante índices de diversidad molecular y la estructura genética mediante índices de diferenciación y fijación, y algoritmos de agrupamiento (Ward, Canónico y Bayesiano). Todos los marcadores SSR resultaron polimórficos en la colección (PIC = 0,532), con un número promedio de alelos por locus $A = 7,43$, alelos efectivos $A_e = 3,04$ y heterocigocidad esperada $H_e = 0,579$. La proporción estimada de variación genética entre las accesiones (G_{ST}) fue 0,251, y la variación dentro de las accesiones fue 0,749. Las distintas técnicas estadísticas identificaron consistentemente cuatro grupos significativamente diferentes. Se confirmó que la colección núcleo de la RBD es representativa de su colección base, conteniendo accesiones de los cuatro grupos identificados sin diferencias significativas entre el número de accesiones observadas y esperadas para cada grupo Ward, de acuerdo al test exacto de Fisher. Las colecciones núcleo y base no difirieron significativamente en A , A_e , H_e , %P, H_s , y la cobertura de clases alélicas fue 82,14%. La investigación también comparó la composición genética de siete accesiones y sus respectivas regeneraciones en México y Uruguay. Mediante test exacto de Fisher, no se detectaron diferencias en la integridad genética de accesiones originales y regeneradas en nueve de los 14 casos. En los restantes seis casos la principal causa de la pérdida de integridad genética fue la pérdida o aparición de alelos indicando posibilidad de procedimientos de regeneración imperfectos.

Palabras clave: colección núcleo, conservación *ex situ*, variedades criollas, maíz de tierras bajas, *Zea mays* L.

Diversity and genetic structure of the Uruguayan White Dent maize germplasm using microsatellites (SSR) markers

SUMMARY

Uruguay holds a great local genetic diversity of maize (*Zea mays* L.) conserved *in situ* as well as *ex situ*. The *ex situ* collection of maize is built up of landraces collected in 1978. It is made up by ten racial types defined by phenotypic traits. Within the collection, White Dent race is particularly interesting due to high biomass and adaptation as forage or silage cropping. A core collection was proposed on the basis of phenotypic traits, integrated by 17 of the 90 White Dent accessions. This research aims to study the genetic diversity and structure among 90 Uruguayan White Dent maize accessions (*Zea mays* L) using 26 SSR markers, and evaluate genetically the representativeness of its core collection previously defined by phenotypic traits. Genetic diversity was assessed by diversity indexes and genetic structure by G_{ST} index, by Ward Clustering, Canonical and Bayesian approach in the basis of genetic frequencies. All SSR markers were polymorphic for the collection (PIC =0.532), with a mean number of alleles $A=7.43$, effective alleles $A_e=3.04$, and expected heterozygosity $H_e=0.579$. The estimated proportion of genetic variation between accessions (G_{ST}) was 0.251, and therefore variation within accessions was 0.749. The collection grouped in four significantly different groups following all the statistical approaches. The core collection was representative of the base collection, with accessions within the four clusters and no difference between the number of observed and expected entries per Ward group according to Fisher exact test. The allelic coverage in the core collection was 82.14. The core and base collections did not differ in A , A_e , H_e , %P, H_s . In addition, this research evaluated genetic integrity of seven accessions with the regenerations in Mexico and Uruguay, through Euclidean distances and significant differences were detected using Fisher exact test for the SSR allelic frequencies. Most regenerations (9/14) preserved genetic integrity of original accessions. In the other cases, lose or appearance of alleles was the main reason for significant genetic differences, and the regeneration procedure could have been imperfect.

Keywords: core collection, *ex situ* collection, landraces, lowlands maize, *Zea mays* L

1.

INTRODUCCIÓN

1.1. LAS VARIEDADES CRIOLLAS

1.1.1. Conceptos generales

En la literatura existen varias definiciones de variedad criolla o variedad local, donde cada una de las definiciones revela diferentes aspectos que las definen. Zeven (1998) definió las variedades criollas como las variedades con una alta capacidad para tolerar estreses bióticos y abióticos, resultando en una alta estabilidad en sus rendimientos, y en rendimientos intermedios en sistemas agrícolas de bajos insumos. Esta definición resalta la adaptación de las variedades criollas al medio en el cual se desarrollaron y se conservan, también denominada rusticidad. En efecto, es una característica que predomina en las variedades criollas, pero no las caracteriza en su conjunto, ni es distintiva de otros tipos de materiales genéticos. En cambio, Louette et al. (1997) definieron a las variedades criollas como las variedades de los agricultores, que no ha sido seleccionada por programas formales de mejoramiento. Esta definición introduce al agricultor y su comunidad como el agente que mantiene y reproduce estas variedades.

Camacho et al. (2005) identificaron seis características que definen a las variedades criollas: (1) genéticamente diversas tanto dentro como entre variedades; (2) distinguibles por sus características morfológicas, de uso o adaptación; (3) origen histórico, son el resultado de procesos de varios ciclos de multiplicación y selección en una determinada región, tanto por una familia de agricultores de generación en generación, o por grupos o comunidades de agricultores; (4) no son el resultado final de programas formales de mejoramiento; (5) adaptación local; (6) asociación a sistemas tradicionales de producción. En el mismo sentido, Teshome et al. (1997) definieron a las variedades locales como una población de plantas variables, adaptadas a condiciones agroclimáticas locales que es nominada, seleccionada y mantenida por agricultores tradicionales para cumplir sus necesidades sociales, económicas, culturales y ecológicas. Por tanto, estos autores plantearon que las variedades locales o criollas y los agricultores tienen una situación de

interdependencia, y cada una de las partes necesita de la otra para su supervivencia. Así, las variedades locales o criollas surgen del proceso de multiplicación, selección y conservación de semillas que realizan artesanalmente los agricultores y sus comunidades.

El germoplasma mantenido por los agricultores tiene un valor intrínseco y un valor de uso. El valor intrínseco, se refiere al valor como un elemento cultural e identitario de los agricultores/as (Vidal 2016). El valor de uso, corresponde al valor como producto comercial, como alimento, forraje y otros usos en el predio, y como fuente de variabilidad para el mejoramiento convencional por su adaptación a las condiciones agroecológicas locales y características agronómicas favorables. Como resultado de procesos de selección natural o selección dirigida por los agricultores, las variedades locales pueden presentar adaptación a ambientes marginales, por lo que constituyen un recurso potencialmente valioso para la agricultura en condiciones adversas (Zhu et al. 2000).

Mundialmente existe preocupación por la pérdida de diversidad genética que ocurre en los predios de productores ubicados en centros de diversidad primarios o secundarios de los cultivos. Esta pérdida de diversidad o erosión genética abarca tanto a las variedades criollas de especies cultivadas como a las poblaciones silvestres de sus especies emparentadas. Las causas de la pérdida de diversidad son diversas: el incremento de la población urbana, cambios culturales, la globalización cultural, la emigración de comunidades indígenas y el éxodo rural desde el campo hacia los centros poblados (Brush 1999; FAO 1997).

Ante los fenómenos de erosión genética se han desarrollado estrategias de conservación de la diversidad genética in situ y ex situ. La conservación ex situ de las variedades criollas comprende material genético, usualmente bajo la forma de semillas colectadas en los predios familiares, acorde a protocolos de colecta diseñados con el fin de captar el máximo de la diversidad teniendo en cuenta la biología reproductiva de la especie. Las semillas colectadas se almacenan en un banco de germoplasma en condiciones de largo plazo (temperatura y humedad relativa controladas), con la mayor caracterización posible. Las condiciones de almacenaje determinan si se conserva a mediano o largo plazo. Uno de los aspectos

limitantes de la conservación *ex situ* es que se considera un proceso estático, y aunque pueden ocurrir cambios genéticos la percepción sobre los mismos es negativa (Wood y Lenne 1997). Los cambios genéticos pueden ocurrir debido a mutaciones y a pérdidas de variabilidad genética cuando la viabilidad de las muestras de las semillas decae (erosión genética). La conservación de las accesiones a baja temperaturas es estable, aunque pueden existir pequeños cambios genéticos (Roberts 1975). De todos modos, las semillas almacenadas no son viables indefinidamente y deben de ser regeneradas periódicamente (Rice et al. 2006).

Con el fin de regenerar las accesiones manteniendo la integridad genética de la muestra originalmente colectada, las accesiones deben de ser plantadas para producir nueva semilla en un sistema de polinización controlada en caso que sea necesario. Durante este proceso, Rice et al. (2006) sostienen que pueden ocurrir cambios genéticos debido a la deriva genética y la selección dada por el ambiente de regeneración, sobre todo si éste no presenta características similares al ambiente de origen. Se han desarrollado protocolos, en base a la teoría genética de poblaciones, a los efectos de mantener al máximo la diversidad genética durante las regeneraciones (Crossa 1989). Asimismo, Crossa et al. (1993, 1994) diseñaron protocolos de colecta de las accesiones.

La diversidad de las accesiones conservadas *ex situ* nunca podrá superar a la de la población que le dio origen; si ello ocurriera, luego de un proceso de regeneración, podría explicarse por contaminaciones con material genético foráneo (fertilización cruzada). Rice et al. (2006) afirmaron que cuando se comenzó la conservación *ex situ*, las colectas se organizaban con especial énfasis en capturar el máximo de la variabilidad fenotípica, conservando distintas variedades y no tanto la diversidad genética dentro de ellas. Posteriormente, en la medida en que se empezaron a utilizar herramientas de genética molecular para determinar la diversidad de los individuos y las poblaciones, tomó importancia como objetivo para las especies alógamas la conservación del máximo de la variabilidad alélica dentro de las variedades y poblaciones (Wang et al. 2004, citado por Rice et al. 2006).

En contraposición a la conservación en bancos de germoplasmas, la conservación de las variedades criollas *in situ - on farm* permite la evolución

dinámica acorde con los cambios ambientales y con las necesidades de los productores mediante su preservación en sus predios, y bajo el manejo del cultivo que se realice (Rivas y Condón 2015). Sin embargo, Rice et al. (2006) señalaron que la conservación *in situ* conlleva riesgos de pérdida de diversidad debido a influencias ambientales y a los cambios socio-económicos de los sistemas de producción. Por tanto, ambas estrategias tienen un rol en la preservación de la diversidad con ventajas y desventajas, y son consideradas complementarias (Altieri y Merrick 1987; Brush 1991). El Convenio de la Diversidad Biológica de las Naciones Unidas (de la que Uruguay es parte desde 1993) establece que la base de la conservación de los recursos genéticos es la complementariedad entre las colecciones *ex situ* y la conservación *on farm – in situ* (Maxted et al. 1997).

1.1.2. Las variedades criollas en Uruguay

Las variedades criollas en Uruguay se originaron a partir de la introducción realizada por diversas corrientes inmigratorias europeas y amerindias, y la subsecuente multiplicación en los predios en forma artesanal durante décadas. Las variedades locales fueron traspasadas de generación en generación dentro de la lógica de los sistemas de producción familiar (González 1999).

En Uruguay, variedades criollas de diversos cultivos han sido utilizadas para el desarrollo de cultivares, a partir del estudio y valoración de los recursos genéticos locales. Las actividades de valoración comprendieron la colecta, caracterización fenotípica mediante descriptores, en algunos casos caracterización mediante marcadores moleculares, evaluación agronómica, conservación *ex situ*, y utilización en el mejoramiento genético.

Variedades criollas de especies forrajeras como avena, lotus y trebol blanco han sido el material base en el desarrollo de cultivares a nivel nacional (Berretta et al. 2007). Por su parte, variedades criollas de trigo fueron utilizadas por Boerger desde 1914 en el programa nacional de mejoramiento de trigo (Boerger 1928). Actualmente las variedades criollas de trigo se conservan solo *ex situ*. Sin considerar las especies forrajeras, en la actualidad las principales variedades criollas en Uruguay, aún

conservadas *in situ*, comprenden maíz (Vidal et al. 2009, 2011; Arenares et al. 2011; Porta et al. 2013), hortalizas (cebolla, ajo, zanahoria, zapallo, acelga, morrón, tomate) y leguminosas alimenticias (poroto, chicharo) (Galván y González, 1992; Galván et al. 2005). Dentro de las especies hortícolas, variedades criollas de cebolla fueron utilizadas como germoplasma adaptado en programas de mejoramiento dando lugar a múltiples cultivares de uso público desarrollados por Facultad de Agronomía e INIA a partir de los años '90. Dentro de las leguminosas alimenticias, en los últimos cinco años desde el ámbito público se han focalizado esfuerzos en el rescate, valorización y evaluación de variedades criollas de chicharo.

Las variedades criollas de maíz han sido utilizadas en programas de mejoramiento formales desde 1914 por Boerger (Boerger 1928). Variedades criollas utilizadas por los programas de mejoramiento desarrollados en Facultad de Agronomía e INIA dieron origen a la liberación de cultivares de polinización abierta de maíz (Vidal et al. 2009). Actualmente, variedades criollas de maíz son conservadas tanto *ex situ* como *in situ - on farm* (Porta et al. 2013).

En Uruguay, las variedades criollas sufren un proceso de desaparición progresiva, como consecuencia de la sustitución por cultivares modernos y de la disminución del número de productores familiares que históricamente han utilizado los recursos fitogenéticos locales (González 1999). Esta erosión genética motivó que en las últimas décadas se realizaran acciones de colecta, conservación *ex situ*, y utilización de los recursos genéticos locales en diversas especies (Galván et al. 2005). El segundo informe país a la FAO sobre el estado de los recursos fitogenéticos indicó que para algunas de las especies cultivadas tradicionalmente ya no existen variedades criollas o quedan muy pocas de ellas (Berretta et al. 2007). Por otra parte, el estado de conservación y documentación en colecciones *ex situ* en Uruguay es incompleto o insuficiente, y se desconoce el nivel de representatividad de estas colecciones (Berretta et al. 2007).

1.2. EL MAÍZ CULTIVADO (*Zea mays* spp. *mays*)

1.2.1. Generalidades

El maíz cultivado (*Zea mays* ssp. *mays*) es uno de los principales cultivos en el mundo, con una amplia distribución ecogeográfica (Monfreda et al. 2008) y se espera un incremento en la producción en las próximas décadas que acompañe la duplicación de la demanda de alimentos hacia 2050 (Rosegrant et al. 2009). El cultivo es afectado por una serie de estreses bióticos y abióticos, contra los cuales el mejoramiento genético es una de las herramientas para aumentar la productividad sin expandir el área (Prasanna 2012). Las variedades criollas son una fuente de diversidad para el mejoramiento futuro, por su adaptación potencial a las condiciones agroecológicas locales y por la presencia de interacciones genotipo × ambiente favorables (Galván et al. 2005).

1.2.2. Origen del maíz cultivado y rutas de dispersión en América

El maíz cultivado sería originado de la domesticación¹ a partir de variantes derivadas del teocinte anual mexicano, de acuerdo a numerosos trabajos reseñados por Kato et al. (2009). Los teosintes son los parientes silvestres más cercanos del maíz cultivado (*Zea mays* spp. *mays*). El maíz cultivado, actualmente es un cultígeno ya que existe sólo en cultivo y no presenta poblaciones silvestres ni naturalizadas.

¹ La domesticación es un proceso evolutivo en el que interviene la actividad humana. Domesticar, con relación a plantas o animales, significa que éstos han sido modificados de su estado silvestre y han sido integrados al hábitat o al entorno humano (Harlan, 1975). La domesticación de plantas y animales es una creación humana que las hace diferentes de sus ancestros silvestres así como también de sus parientes silvestres actuales (Smith, 1998). Según Darwin (1859) la domesticación de plantas y animales desde tiempos prehistóricos por parte del hombre se logró mediante la selección. La clave para la generación de las razas domésticas “*ya sea desde una o varias especies aliadas*” radica en el poder de la “*acumulación selectiva: la naturaleza produce variación sucesiva; el ser humano la expande en la dirección que le es más útil.*” (Extractos del capítulo uno de: El Origen de las Especies donde analiza la variación de las especies domesticadas).

Los teosintes están representados por las especies perennes diploide *Zea diploperennis* y la tetraploide *Zea perennis* (Iltis and Doebley 1980; Iltis and Benz 2000), y las especies anuales diploides *Zea luxurians*, *Zea nicaraguensis*, y *Zea mays*. Doebley e Iltis (1980) basados en principios taxonómicos propusieron la división del género *Zea* en las secciones *Luxuriantes* y *Zea*. La sección *Luxuriantes* comprende los teocintes anuales de Centroamérica (*Z. luxurians* y *Z. nicaraguensis*) y los teocintes perennes de México (*Z. diploperennis* y *Z. perennis*). La sección *Zea* está compuesta solamente por la especie *Zea mays*, la cual incluye una subespecie anual de Guatemala, *Z. mays* ssp. *huehuetenanguensis*, las subespecies de teocintes anuales de México (*Z. mays* ssp. *mexicana*, *Z. mays* ssp. *parviglumis*) y al maíz cultivado *Z. mays* ssp. *mays* (Iltis y Doebley 1980; Doebley 1990).

En base al análisis de la distribución geográfica de maíces y teosintes presentando variantes en la arquitectura cromosómica (distribución de nudos -knobs- en sus cromosomas) se postulo la teoría multicentrica del origen del maíz (McClintock 1978; McClintock et al. 1981; Kato 1984). La distribución geográfica de genotipos que muestran variantes en los patrones de distribución de nudos (knobs) cromosómico indicarían que el maíz habría sido originado y domesticado en varias regiones del sur y oeste de México y el norte de Guatemala (Mesoamérica) (McClintock 1978; McClintock et al. 1981; Kato 1984; Kato 2005).

En contraposición a la teoría multicéntrica, la teoría unicéntrica sostenida por Matsuoka et al. (2002) y Vigouroux et al. (2008) argumenta que el maíz se originó en un único centro, la cuenca del río Balsas, mediante mutaciones puntuales en el genoma de *Zea mays* subsp. *parviglumis* también conocido como teosinte raza Balsas. Kato et al. (2009) cuestionan fuertemente la teoría unicéntrica, y argumentan que el mecanismo planteado por la teoría unicéntrica no es capaz de explicar la diversidad racial existente en México en la actualidad.

La antigüedad del proceso de domesticación, puede ser datada mediante fitolitos, granos de almidón fósiles así como también mediante análisis moleculares de genes involucrados en los cambios entre el teosinte y maíz (Kato et al. 2009). Utilizando los genes que diferencian el maíz del teosinte, Benz (2006) estimó que el proceso de domesticación comenzó unos 10.000 a 11.000 años atrás.

A medida que se incrementó su cultivo en su lugar de origen y domesticación, las variantes en cariotipos cromosómicos en base a los complejos de nudos cromosómicos migraron a lo largo de rutas diferentes y definidas (Kato et al. 2009). Existen regiones donde convergieron las rutas de migración de dos o más complejos de nudos cromosómicos de cuya hibridación y selección posterior surgieron nuevas razas² de maíz. Esta teoría supone que a mayor número de complejos que originalmente convergieron en una región dada, mayor fue el número de razas² que emergieron (Figura 1) (Kato et al. 2009).



Figura 1. Centros de origen y domesticación del maíz cultivado, centros de diversificación primaria y las rutas migratorias iniciales del maíz cultivado (Figura tomada de Kato et al. 2009).

² Anderson and Cutler (1942) definieron una raza como "un grupo de individuos emparentados, con suficientes características en común para permitir su reconocimiento como grupo". Anderson (1947) estableció que "el maíz es un sensible espejo de las personas que lo cultivan". Este enunciado resalta la importancia de la selección llevada a cabo por los agricultores en la formación de razas, además de la importancia de la selección natural y la interacción genotipo × ambiente (Bracco et al. 2016).

Vigouroux et al. (2008) estudiaron la diversidad presente en 310 razas de América representadas por 964 plantas individuales, utilizando 96 microsátélites. Mediante agrupamiento bayesiano determinaron cuatro grupos raciales: Altiplanicie Mexicana, Norte de Estados Unidos, Tierras Bajas Tropicales y Los Andes. Dado que Vigouroux et al. (2008) adhieren a la teoría unicéntrica de Matsuoka et al. (2002) consideraron que todos los grupos se originaron a partir de la Altiplanicie Mexicana, la región con el grupo más diverso genéticamente. El muestreo de sólo una o dos plantas por raza realizado por Vigouroux et al. (2008) les impidió discriminar los distintos grupos raciales que existen dentro de la Altiplanicie Mexicana, zona que además abarca altitudes bajas y medias (Perales y Golicher 2014; Kato et al. 2009).

Kato et al. (2009) establecen que la costa atlántica de Sudamérica recibió maíces del sur y del oriente de México (maíces tropicales de las tierras bajas), mientras que la costa sudamericana del Pacífico recibió materiales provenientes del occidente mexicano, con al menos dos corrientes migratorias independientes de maíz de México hacia Sudamérica. Esta hipótesis es consistente con los resultados obtenidos por Freitas et al. (2003), quienes analizaron las frecuencias génicas del gen *Adh2* mediante microsátélites en muestras arqueológicas de maíz del este y oeste Sudamericano.

1.2.3. Diversidad racial del maíz cultivado en América

El occidente sudamericano, especialmente la región andina, se caracteriza por el cultivo de razas de maíz cuyos granos tienen endospermos harinosos y dulces y en otros tipos el grano tiene una punta curvada en la corona. En el noreste y en la costa atlántica sudamericana el tipo de grano de los maíces corresponde predominantemente a los tipos flint y dentados, y los pocos harinosos y puntiagudos se sabe que fueron introducidos de la costa occidental sudamericana (Kato et al. 2009, basados en Roberts et al. 1957; Brieger et al. 1958; Ramírez E. et al. 1960; Timothy et al. 1961; Grobman et al. 1961; Timothy et al. 1963; Grant et al. 1963).

Actualmente se considera que en el continente americano existen entre 220 (Brown y Goodman 1977) y 310 (Vigouroux et al. 2008) razas de maíz. El tipo de grano de las razas se compone de endosperma harinoso en el 40% de las razas, de

tipo vítreo o flint en casi el 30%, algo más del 20% de las razas presentan granos de tipo dentado, cerca del 10% son del tipo popcorn o reventador, y sólo cerca del 3% de las razas corresponden al maíz dulce (Nas y Paterniani 2000). Paterniani y Goodman (1977) establecieron que el 50% de las razas están adaptadas a bajas altitudes –maíces de las tierras bajas– (entre 0 y 1000 metros), casi el 40% crecen en elevaciones superiores a los 2000 metros (maíces de las tierras altas), mientras que un porcentaje algo superior al 10% de las razas están adaptados a altitudes intermedias (1000 a 2000 metros).

La diversidad racial presente en nuestra región, incluyendo a Brasil y áreas adyacentes con altitudes menores a los 1500 metros, consta de 19 razas y 15 subrazas comprendidas en los territorios de Argentina, Uruguay, Brasil, Paraguay, las tierras bajas de Bolivia y las Guayanas. Este territorio comprende un área total de 12.885.000 km² que representa el 72% del área de Sudamérica (Paterniani y Goodman 1977). Las razas y subrazas encontradas por Paterniani y Goodman (1977) fueron clasificadas en cuatro grandes grupos: indígenas, comerciales antiguas, comerciales recientes y exóticas. Si bien no se han realizado relevamientos y caracterizaciones raciales posteriores que abarquen la totalidad de esta superficie, trabajos actuales con alta intensidad de muestreo en microregiones demuestran que actualmente podría existir un mayor número de razas (de Almeida Silva et al. 2016; Vidal 2016).

1.3. EL MAÍZ CULTIVADO EN URUGUAY

1.3.1. Conservación *in situ* del maíz cultivado en Uruguay

Al igual que en otros territorios de la costa atlántica de Brasil, en el territorio uruguayo existen evidencias fósiles indirectas sobre la presencia de maíz en culturas precolombinas desde hace 4100 años AP (Iriarte et al. 2004; Beovide et al. 2013). Así como también de su cultivo desde los inicios del período colonial, con una larga tradición de usos (Pérez Castellano 1814; Berro 1975). Pérez Castellano (1814) reporta la existencia de diferentes tipos de maíz cultivados a finales del siglo XVIII y durante principios del siglo XIX en Uruguay. Este autor describe cuatro tipos de

maíz que se distinguen entre ellos por características como ciclo, color de grano (blanco, anaranjado y rojo intenso), tipos de grano (amiláceo, duro y reventador) y morfología del grano, así como en sus características organolépticas y usos. La primera colecta y caracterización de maíz que incluyó accesos de Uruguay fue realizada por Brieger et al. (1958) en un relevamiento de los maíces de las tierras bajas de Sudamérica. Estos autores identificaron cuatro razas (Avati, Lenha, Catetos del Sur y Canario de Ocho) y una importante diversidad de usos.

La colecta de maíces realizada por la Facultad de Agronomía en 1978 y su posterior caracterización revelaron la presencia de 10 tipos raciales con una gran diversidad y potencial agronómico (De María et al. 1979; Salhuana et al. 1998). Actualmente, de acuerdo a un relevamiento realizado solo en localidades del departamento de Tacuarembó, persisten los tipos raciales relevados en el año 1978, con la excepción del maíz pisingallo que no fue reportado en la actualidad, y se constató la introducción de nuevos materiales que se clasificarían en una nueva raza. Las variedades criollas de maíz son un elemento sustancial en algunos sistemas de producción familiares, que las conservan para su utilización como alimento humano y como reserva de forraje (Porta et al. 2013).

En Uruguay en los últimos años, la disminución del número de productores y los cambios en la tipología de los predios, con predominio de la agricultura industrial, habrían reducido la diversidad en el germoplasma local de maíz. Actualmente coexiste una producción industrializada mayoritaria en volumen basada en híbridos modernos, en su mayoría transgénicos (eventos para resistencia a insectos y resistencia a herbicidas), con una producción tradicional de maíz para uso en el predio, artesanal minoritaria en área y mayoritaria en número de productores, que mantiene una gran diversidad de recursos genéticos locales. Por ejemplo, en la zafra 2012-13 se sembraron 120 mil ha, participando de la misma 2835 productores. El 80% de los productores sembraron menos de 20 ha, y representaron un 3,5% del área total sembrada con maíz (MGAP-DIEA 2013).

Si bien las encuestas de producción no relevan específicamente el origen de la semilla, una parte significativa de la producción familiar en pequeña escala está basada en variedades criollas. El relevamiento reciente en Tacuarembó identificó

numerosas variedades criollas de maíz en manos de los productores, algunas de las cuales a pesar de tener más de medio siglo de uso nunca habían sido colectadas en las expediciones realizadas en 1978 (Porta et al. 2013). El relevamiento comparó la diversidad existente en el presente en zonas donde se había colectado en 1978, y se encontró disminución de la diversidad para la característica tipo de grano, además de existir un menor número de predios con cultivo y con sus variedades criollas asociadas. En tanto, para la característica color de grano se encontró un aumento de la diversidad en comparación con las variedades criollas colectadas en 1978 en las mismas localidades (Porta et al. 2013).

Así, en muchos casos y tiempo después de los esfuerzos de colecta realizados en 1978, se desconoce la diversidad actualmente en manos de los productores y la evolución que pudo tener a través del tiempo. También se desconoce el grado de mantenimiento en cultivo, y cómo ha evolucionado la diversidad genética por efecto de la recombinación, selección, migración y cuello de botella o deriva genética posteriores. De acuerdo a relevamientos realizados para la raza Blanco Dentado en el litoral del país (Departamento de Colonia y Soriano) (Vidal et al. 2011), el mantenimiento en cultivo de las variedades criollas colectadas en 1978 decayó ampliamente, sobre todo por el cese de actividades de los productores de avanzada edad y la no continuidad de la actividad por las siguientes generaciones. Este hecho fue coincidente a lo detectado en el sur del país por Fassio A. (comunicación personal, junio 2016).

Para la conservación y utilización de los recursos genéticos de variedades criollas de maíz, es imprescindible su revalorización. Esto requiere la identificación de las regiones geográficas donde existen variedades criollas conservadas por los agricultores, caracterización de las variedades y de la utilización que le dan las personas que las conservan. Se requiere establecer acciones para mejorar la conservación *in situ* de los recursos genéticos realizada por los productores, en coordinación con sus organizaciones.

1.3.2. Conservación *ex situ* del maíz cultivado en Uruguay

La colección *ex situ* de maíz uruguayo está integrada por 852 accesiones colectadas por Facultad de Agronomía en predios de productores en 1978, bajo la financiación del *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR). Actualmente, la colección se encuentra en el Banco de Germoplasma de INIA "La Estanzuela" y presenta réplica en el Banco de Germoplasma de Maíz de CIMMYT, Mexico (Malosetti y Abadie 2001). De María et al. (1979) determinaron la presencia de diez tipos raciales en la colección *ex situ* (Tabla 1), en base a características como la morfología del grano y de la espiga, siguiendo las líneas generales de Paterniari y Goodman (1977) para la determinación de las razas. La colección *ex situ* ha sido caracterizada y clasificada solo en base a características fenotípicas de grano, espiga y planta entera (De María et al. 1979, Fernández et al. 1983; Gutiérrez et al. 2003).

Tabla 1. Composición racial de la colección *ex situ* de maíz de Uruguay (De María et al. 1979) Razas determinadas en base a caracteres fenotípicos de grano, espiga y planta entera siguiendo las líneas de Paterniari y Goodman (1977) número de accesiones para cada una de las razas y su porcentaje considerando 852 accesiones totales (Adaptado de Malosetti y Abadie 2001).

Raza	Número de accesiones	Porcentaje en la colección
Cateto Sulino	454	53,3
Morotí	91	10,7
Blanco Dentado	90	10,6
Semidentado Rio-grandense	68	8,0
Cateto Sulino Grosso	51	6,0
Cuarentino	40	4,7
Dentado Rio-grandense	25	2,9
Pisingallo	23	2,7
Cristal	6	0,7
Canario de Ocho	4	0,5
Total (10 razas)	852	100

En un análisis georreferenciado de las diferentes colecciones de variedades criollas de maíz realizadas en Sudamérica en los años setenta, Vilaró (2013) encontró que la diversidad en el número de razas de maíz mantenidas en algunas localidades de Uruguay en 1978 era comparable a la diversidad existente en los sitios de mayor diversidad de la región, como Bolivia y Paraguay.

1.3.3. La raza de maíz Blanco Dentado en Uruguay

Según Paterniani y Goodman (1977), los indígenas Guaraníes poseían maíces de la raza Morotí, y dentro de ésta tenían en escala menor una variedad de color blanco. La raza Morotí tuvo muy baja respuesta heterótica cuando se la cruzó con la raza Caingang (Paterniani and Lonquist 1963), hecho que sustenta la hipótesis del elevado parentesco que existe entre ambas razas determinadas por Brieger et al. (1958). La raza Caingang ha sido cultivada por los indígenas del mismo nombre que habitaban desde San Pablo hasta Uruguay. La raza Caingang es una raza indígena con granos de endosperma harinoso y es la única raza indígena de la zona que posee granos blancos dentados dispuestos en espigas cilíndricas. La raza Caingang es la raza indígena que más se ajusta a los estándares requeridos para el maíz comercial, por lo que es un material muy promisorio para trabajos de mejoramiento (Brieger et al. 1958). Está adaptada a condiciones subtropicales con precipitaciones medias y bajas altitudes (Paterniani and Goodman, 1977).

Paterniani y Goodman (1977) también citan, para la zona desde San Pablo hasta Uruguay, la raza Dente Branco que presenta grano grande con endosperma blanco y de tipo dentado. La raza está dividida en dos subrazas Dente Branco Riograndense en los estados de Rio Grande Do Sul y Santa Catarina y la subraza Dente Branco Paulista, que se cultiva en pequeña escala en los estados de San Pablo, Paraná y Minas Gerais. El germoplasma de la raza Branco Dentado, según Paterniani y Goodman (1977), fue introducido desde Estados Unidos con los inmigrantes ingresados en Brasil durante la Guerra de Secesión Estadounidense (1861-1865). Desde su ingreso ha sido mantenida localmente en algunos casos con pequeñas introgresiones desde las razas indígenas Morotí y Caingang (Paterniani y Goodman 1977).

En Uruguay existen reportes de la existencia de maíz blanco en los relatos de Pérez Castellano (1814). De acuerdo con la descripción del tipo de grano se podría asumir que corresponde con la raza Morotí, variedad blanca. Por su parte, durante el verano 1914/1915 Boerger (1928) realizó un ensayo de adaptación de germoplasma de maíz nacional y extranjero. Entre los materiales evaluados, reporta maíces Blanco Dentados introducidos desde Norteamérica para silo y para forraje, así como también reporta un maíz "Blanco del país" y uno "Blanco de la zona" sur oeste (Boerger 1928). Teniendo en cuenta los registros históricos y el relevamiento realizado por Paterniani y Goodman (1977) en zonas vecinas, se podría asumir que el germoplasma de maíz de la raza Blanco Dentado en Uruguay proviene de diferentes orígenes: razas indígenas como el Morotí y el Caingang, y razas de origen Norteamericano con diversos momentos de ingreso.

Dentro de la colección *ex situ* de maíz, 90 accesiones corresponden a la raza Blanco Dentado, y se ha mantenido su clasificación como tal aplicando diferentes metodologías (De María et al. 1979; Malosetti y Abadie 2001; Gutiérrez et al. 2003). La raza Blanco Dentado fue evaluada como un material genético con aptitud para la producción de silo (Abadie et al. 1997), ya que presenta un destacado comportamiento en producción de grano y rendimiento de forraje (Fernández et al. 1983; Salhuana et al. 1998; Ozer Ami et al. 2004).

Las variedades criollas tienen potencial para el desarrollo de cultivares adaptados a ambientes específicos, con bajo uso de insumos (Kist et al. 2010, Ferrer 2009), así como para usos específicos como la producción de forraje (Vidal et al. 2009). Con posterioridad a la caracterización fenotípica de las variedades criollas de maíz colectadas en 1978, se realizaron experiencias de utilización en el mejoramiento genético. Algunas accesiones de la colección de Blanco Dentado participaron en evaluaciones realizadas por el *Germplasm Enhancement of Maize (GEM) project* de Estados Unidos (USA), con el fin de ampliar la base genética de las líneas de mejoramiento de sus programas. Salhuana et al. (1998) analizaron el potencial para mejoramiento de accesiones de maíz originarias de Argentina, Chile, Uruguay y USA e identificaron cuatro accesiones de la colección uruguaya que mostraron alta aptitud combinatoria cuando fueron testeadas con tres fuentes de

polen de importancia histórica en el mejoramiento del maíz de USA (B73xB14A, SR76, Oh43xMo17). Tres de las cuatro accesiones uruguayas pertenecían a la raza Blanco dentado (URZM 10001, URZM 11002 y URZM 11003).

En 1981 se utilizaron las 90 accesiones de la raza Blanco Dentado para realizar un compuesto racial (Abadie et al. 1997). Este compuesto racial demostró tener mayor rendimiento de biomasa que un híbrido contemporáneo muy utilizado para silo (Padrón y Lust 1985). Debido a su buena aptitud agronómica, el compuesto racial generado a partir de la colección de Blanco Dentado constituyó la base genética en la creación del cultivar “Blanco Cangüé” liberado por Facultad de Agronomía en 1997 (Ceretta et al. 1997, Vidal et al. 2009). El cultivar “Blanco Cangüé” es una variedad de polinización abierta, de alta producción de forraje, de buena adaptación agroclimática y adaptación a ambientes de bajo y alto potencial de rendimiento, en particular, rendimientos aceptables en condiciones de sequía (Medina et al. 2001, Vidal et al. 2009). El cultivar es adecuado para silo así como también para pastoreo directo (Barreto y Del Puerto 2001) ya que presenta buen potencial de rebrote (Arenares et al. 2011). Mostró alta calidad nutricional expresada en energía metabolizable y energía neta de lactancia (Alessandri 2012).

Los trabajos de evaluación agronómica del cultivar “Blanco Cangüé” para forraje y ensilaje (para alimentación animal con la planta entera) favorecieron la aceptación y adecuación a sistemas lecheros y de ganadería intensiva en la región sur (Arenares et al. 2011; Alessandri 2012; Ramos et al. 2013). Los rendimientos de biomasa fueron similares al promedio del ensayo durante seis evaluaciones oficiales, principalmente integrada por híbridos modernos, y superaron el promedio en años secos (Vidal et al. 2009). La buena capacidad de adaptación reflejada en el buen rendimiento sería resultado de la selección realizada en condiciones locales. Como parte de procesos de valorización se han establecido acuerdos con organizaciones de productores para la producción de semilla, y con PROLESA para la provisión de la semilla del cultivar para la producción lechera.

1.4. LAS COLECCIONES NÚCLEO

1.4.1. Generalidades

Brown (1989a,b) definió las colecciones núcleo como un subconjunto de accesiones dentro del total de una colección de germoplasma que captura, con un mínimo de redundancia, la mayoría de la diversidad genética presente en el total de la colección (colección base). Las colecciones núcleo pueden ser desarrolladas utilizando los datos de pasaporte, de caracterización fenotípica y/o mediante marcadores bioquímicos o moleculares y los datos de evaluación agronómica, pudiéndose utilizar sólo alguno de estos tipos de datos o combinaciones de ellos. En la mayoría de los casos las colecciones núcleo más representativas de la colección base se logran mediante la utilización de los datos de caracterización y evaluación en combinación con los datos de pasaporte (Prasanna 2010). Las colecciones núcleo son particularmente útiles en los programas de mejoramiento pequeños donde se necesita de pocas accesiones con amplia diversidad genética, o también cuando es necesario intercambiar entre países una muestra representativa de la diversidad genética total (Prasanna 2010).

1.4.2. Colección núcleo de maíz de Uruguay

Malosetti y Abadie (2001) diseñaron una colección núcleo a partir de la colección base de maíz uruguayo integrada por 852 accesiones distribuidas en 10 razas (Tabla 1). Para ello, se basaron en la caracterización fenotípica realizada por De María et al. (1979), y publicada en el catálogo de recursos genéticos de maíz del Cono Sur (Fernández et al. 1983). Dado que la diversidad fenotípica se encuentra distribuida entre y dentro de grupos con diferentes grados de organización, previo a la selección de las accesiones a integrar la colección núcleo, se debe realizar una adecuada clasificación de las accesiones en grupos relacionados. En primer lugar, mediante un análisis de componentes principales, Malosetti y Abadie (2001) detectaron que los diez tipos raciales de la colección se agrupaban en cuatro grupos determinados por el tipo de grano de las accesiones. Los cuatro grupos identificados según el tipo de grano fueron dentado (raza Blanco Dentado), pipoca (raza

Pisingallo), harinoso (raza Morotí) y el grupo de los flint-semiflint que reúne a las restantes siete razas (Cateto sulino, Semidentado riograndense, Cateto sulino groso, Cuarentino, Dentado riograndense, Cristal y Canario de ocho).

El tipo de grano se considera un carácter con buen poder discriminante entre grupos, y es más discriminante que la clasificación racial. Brieger et al. (1958) y Goodman (1976) establecieron que en una primera etapa de la domesticación del maíz se ubican los maíces de tipo de grano pipoca, seguidos por los flint y semiflint. El maíz con tipo de grano harinoso, muy utilizados por las comunidades indígenas de Sudamérica, correspondería a una tercera etapa de domesticación, y por último los más modernos serían los de tipo de grano dentado. Las distancias de agrupamiento entre los cuatro grupos encontrados por Malosetti y Abadie (2001) son coincidentes con las etapas de domesticación del maíz, lo cual resalta la importancia del carácter tipo de grano en el agrupamiento de las accesiones.

Con el fin de agrupar las accesiones, Malosetti y Abadie (2001) utilizaron métodos multivariados y compararon tres estrategias diferentes para la clasificación de las accesiones de la colección base. La estrategia de clasificación de la colección mediante el tipo de grano conjuntamente con el origen geográfico de las accesiones resultó ser la mejor regla de clasificación. Además, esta estrategia toma en cuenta la división ecogeográfica y la división morfológica, dos puntos estrechamente relacionados con la distribución de la diversidad. De este modo, las accesiones fueron clasificadas en cinco grupos diferentes: pipoca, harinosos, dentados, flint-semiflint del sur y flint y semiflint del norte del país. La cantidad de accesiones que integran cada uno de los grupos se muestra en la Tabla 2. Las accesiones con tipo de grano dentado y pipoca son en su mayoría de la región sur, los harinosos provienen de la región norte, en tanto que las accesiones con tipo de grano flint y semiflint son la mayoría de la colección encontrados en todo el país.

Tabla 2. Grupos en la colección *ex situ* de maíz de Uruguay de acuerdo al tipo de grano y origen geográfico, número de accesiones por grupos y número de accesiones integrantes de la colección núcleo para cada grupo determinado mediante la estrategia logarítmica y el método de diversidad relativa (Adaptado de Malosetti y Abadie 2001).

Grupo	N° de accesiones	N° Accesiones en la colección núcleo (% del grupo)
Dentado	90	17 (18.8%)
Pipoca	23	12 (52.2%)
Harinoso	90	17 (18.8%)
Flint-Semiflint del sur	449	24 (5.35%)
Flint-Semiflint del norte	193	20 (10.4%)
<u>Total</u>	<u>845</u>	<u>90 (10.7 %)</u>

Luego de determinar los grupos en la colección base, Malosetti y Abadie (2001) testearon diferentes metodologías para la elección de las accesiones a integrar la colección núcleo. La combinación de la estrategia logarítmica (Brown 1989b) y el método de Diversidad Relativa (Diwan et al. 1995) logró el mayor porcentaje de retención de rangos (91% en promedio para las 17 variables fenotípicas utilizadas). La selección estratificada aplicada por Malosetti y Abadie (2001) asegura el mantenimiento del máximo de diversidad con un mínimo de redundancia. La colección núcleo resultó integrada por 90 de las 852 accesiones de la colección base de maíz uruguaya (Tabla 2).

1.4.3 Colección núcleo de la raza Blanco Dentado uruguaya

La colección núcleo para la raza Blanco Dentado está integrada por 17 accesiones del total de las 90 accesiones pertenecientes a esta raza (Malosetti y Abadie 2001) (Tabla 2). Ozer Ami et al. (2004) confirmaron específicamente la colección núcleo de la raza Blanco Dentado (Figura 2) utilizando la evaluación fenotípica publicada por Fernández et al. (1983). La colección núcleo para la raza Blanco dentado contiene el 18,8% de las accesiones de la colección base de esta raza. Esta alta proporción de accesiones integrando la colección núcleo se debe a la alta

variabilidad fenotípica que presenta la raza Blanco Dentado (Ozer Ami et al. 2004). Si se tomara sólo el 10% de las accesiones, tal como lo recomienda la literatura, no se lograría una colección núcleo representativa (Ozer Ami et al. 2004).

Para las 90 accesiones de la raza Blanco Dentado, Ozer Ami et al. (2004) definieron tres sub-grupos en base a un análisis multivariado (o de componentes principales) y análisis de conglomerados mediante el método de Ward utilizando la distancia Euclidea al cuadrado entre accesiones como estimador de las distancias. Los sub-grupos se diferenciaron por rendimiento de grano, rendimiento de forraje y duración del ciclo (período de siembra a maduración). Las accesiones de cada sub-grupo que formaron la colección núcleo (Figura 2) fueron elegidas sólo en base a análisis estadísticos de la variabilidad fenotípica dado que no se cuenta con información genética molecular de las accesiones.

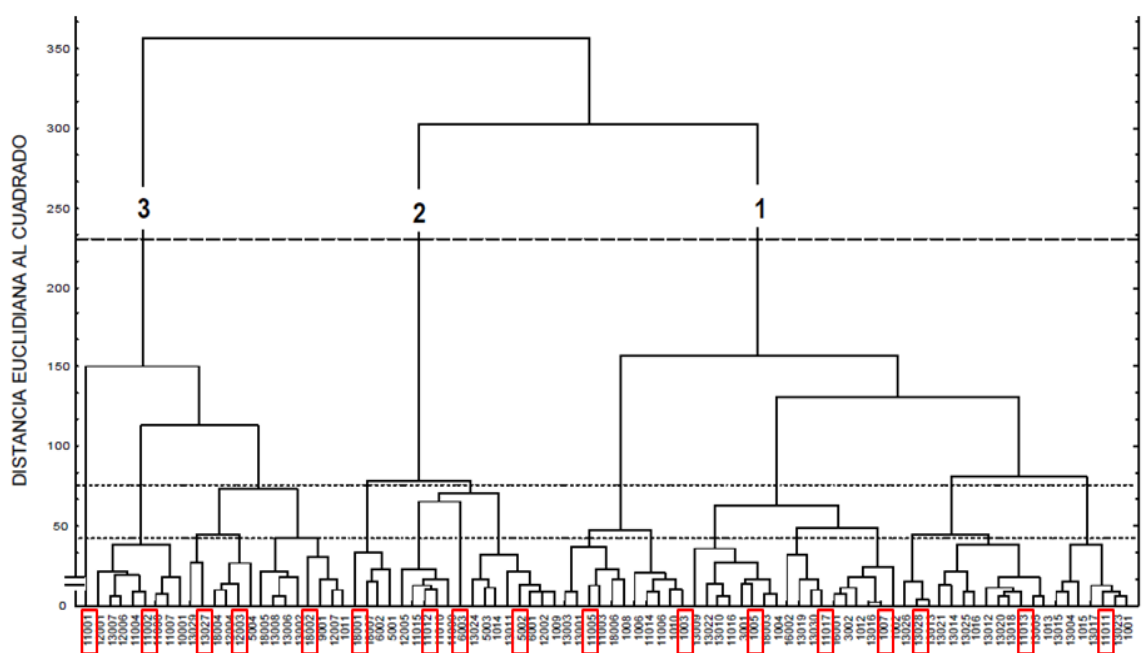


Figura 2. Dendrograma de las 90 accesiones de la raza Blanco Dentado, con la identificación de tres grupos principales, mostrándose también los cortes para la formación de 9 y 17 grupos. Las accesiones integrantes de la colección núcleo (17) se señalan con rectángulos rojos. Adaptado de Ozer Ami et al. 2004.

La variabilidad fenotípica no siempre representa la variabilidad genética real debido a las interacciones genotipo \times ambiente que afectan la expresión fenotípica, y debido a que los caracteres morfológicos y agronómicos están determinados en la mayoría de los casos por combinaciones de múltiples genes de efecto menor (Smith y Smith 1992). Evaluaciones y caracterizaciones adicionales de la colección base, como puede ser la caracterización genética de las accesiones mediante marcadores moleculares, podrían contribuir a mejorar el diseño de la colección núcleo o confirmar el diseño actual (Malosetti y Abadie 2001). La colección *ex-situ* de maíz uruguayo hasta el desarrollo del presente estudio no contaba con caracterización molecular.

1.5. ESTRUCTURA GENÉTICA DE UNA COLECCIÓN

1.5.1. Significancia para el mejoramiento genético

El conocimiento de las relaciones genéticas entre accesiones es importante para organizar el germoplasma y conducir la conservación adecuada (Pejic et al. 1998; Thormann et al. 1994). Las relaciones de similitud o distancia genéticas entre accesiones son importantes para estimar posibles pérdidas de diversidad genética, así como para determinar la variabilidad genética disponible y su potencial uso en programas de mejoramiento mediante diseños estratégicos. Asimismo, las relaciones genéticas entre accesiones posibilitan la elección de genotipos prioritarios en la conservación (Thormann et al. 1994).

En lo que respecta al potencial uso en el mejoramiento, Xia et al. (2004) establecieron que el conocimiento detallado de la diversidad genética y de las relaciones entre las accesiones es indispensable para el desarrollo de nuevas líneas endocriadas de maíz, la asignación de las líneas endocriadas a grupos heteróticos bien definidos, y la elección de los testers en los ensayos de combinaciones híbridas en el mejoramiento del maíz. También contribuye a la planificación de los cruzamientos entre diferentes líneas en los programas de mejoramiento (Pejic et al. 1998).

En base a resultados teóricos y experimentales, Melchinger (1999) demostró que la organización del germoplasma en grupos heteróticos genéticamente divergentes permite explotar la heterosis entre materiales de manera sistemática y óptima. Choukan et al. (2006) proponen que cuando aún no están establecidos los grupos heteróticos, el agrupamiento de los materiales mediante el análisis de diversidad y estructura con marcadores SSR puede utilizarse como grupos heteróticos preliminares previo a la realización de los cruzamientos a campo para su confirmación. Los grupos heteróticos, una vez definidos, posibilitan que los mejoradores realicen menor número de cruzamientos, ya que pueden maximizar la heterosis (vigor híbrido) mediante cruzamientos entre materiales más diversos y no entre materiales de un mismo grupo.

1.5.2. Herramientas para la caracterización de las colecciones

La variación en el fenotipo y los perfiles genéticos definidos por marcadores moleculares, aún cuando éstos últimos no siempre detectan variación expresada a nivel fenotípico, ambos han sido explotados para caracterizar y manejar la diversidad genética del germoplasma en las colecciones de varias especies de plantas (Belaj et al. 2011). Las evaluaciones morfológicas son eficientes en la determinación del valor agronómico, y han sido de gran valor en estudios de evolución de los cultivos, evolución del germoplasma y para revelar diferencias entre variedades. Si bien los marcadores morfológicos son directos, de bajo costo y de fácil medición, tienen bajo polimorfismo, baja heredabilidad en la mayoría de los casos, se encuentran en número limitado, no son buenos en detecciones tempranas, y son afectados por las condiciones ambientales (Smith y Smith 1992).

Los caracteres morfológicos y los marcadores moleculares son frecuentemente usados en estudios de diversidad genética para desarrollar estrategias de conservación, y para facilitar el manejo y desarrollo de los recursos genéticos vegetales (Sharma et al. 2010; Saeed et al. 2011, Cömertpay et al. 2011). En el caso de las variedades locales de maíz, la variabilidad genética ha sido primeramente caracterizada mediante caracteres morfológicos (Goodman 1967; Goodman y Paterniani 1969; Sánchez y Goodman 1992; Llauro y Moreno-Gonzalez 1993;

Goodman y Bird 1977; Herrera et al. 2004; Brandolini y Brandolini 2001, Malosetti y Abadie 2001; Hartings et al. 2008), y por la diversidad en isoenzimas y proteínas de almacenamiento en las semillas (Goodman y Stuber 1983; Bretting et al. 1990). Las caracterizaciones moleculares para complementar los datos morfológicos se han intensificado en los últimos tiempos (Warburton et al. 2002, 2010; Prasanna et al. 2007; Reif et al. 2004, 2005a; Dubreuil et al. 2006; Hamblin et al. 2007, Lia et al. 2009, Eschholz et al. 2008, 2010; Sharma et al. 2010, Cömertpay et al. 2011).

Los marcadores moleculares proveen una medida directa de la diversidad genética no expresada a nivel fenotípico, ya que presentan mayor polimorfismo. Ello aumenta el poder de diferenciación en comparación al uso de los caracteres morfológicos, o los datos pasaporte como el origen geográfico que frecuentemente son tenidos en cuenta en la clasificación de recursos genéticos. Las caracterizaciones con marcadores moleculares, realizadas en un número adecuado de individuos dentro de poblaciones y con alto número de marcadores, son más robustas y en el caso de utilizar marcadores automatizables son más prácticas que las caracterizaciones fenotípicas (Cömertpay et al. 2011).

A su vez los análisis moleculares de poblaciones genéticamente heterogéneas han sido siempre muy costosos y demandantes de tiempo, dado que la variabilidad tiende a estar particionada en mayor medida dentro de cada población que entre poblaciones de maíz, y los niveles de variabilidad pueden ser muy altos (Eschholz et al. 2008). La estructura genética de las poblaciones de maíz determina que al menos 15 individuos deben ser caracterizados con el fin de representar adecuadamente la diversidad alélica presente en la población en estudio (Prasanna et al. 2010).

1.5.2.1. Los microsatélites en estudios de diversidad y estructura genética de variedades criollas de maíz

Entre los marcadores moleculares más utilizados en análisis de diversidad y estructura genética de poblaciones locales de maíz están los microsatélites o SSR (*simple sequence repeats*, repetidos de secuencias simples) debido a su naturaleza codominante, abundancia en el genoma de maíz, disponibilidad en bases públicas (MaizeGDB; <http://www.maizegdb.org>), alto polimorfismo, precisión en la

información generada y su gran repetibilidad y confiabilidad (Powell et al. 1996, Legesse et al. 2007; Hartings et al. 2008; Bourguiba et al. 2010; Prasanna et al. 2010). Los marcadores SSR son muy útiles y adecuados para el estudio de la diversidad genética del germoplasma. Por ejemplo, Liu et al. (2003) clasificaron en clusters diversas líneas endocriadas representativas del mejoramiento genético en Estados Unidos, en base a 2039 alelos identificados para 94 marcadores SSR. Rief et al. (2004) estudiaron 23 poblaciones de maíz de CIMMYT y determinaron sus niveles de heterocigosis promedio y la diferenciación genética entre poblaciones, en base a 666 alelos obtenidos con 83 marcadores SSR. A su vez, el análisis de SSR utilizando cebadores marcados con fluorescencia en un secuenciador de ADN potencia aún más la eficiencia y precisión del genotipado (Blacket et al. 2012). Xia et al. (2004) establecieron que los loci SSR han demostrado ser exitosos en estudios de diversidad genética y estructura poblacional del maíz debido a su alta diversidad alélica y su naturaleza codominante.

Los marcadores basados en el polimorfismo de nucleótido simple o SNP (*single nucleotide polymorphism*) son actualmente muy utilizados en el análisis genético de plantas por ser precisos, automatizables y con abundante variación dentro de los genomas. Por ejemplo, se ha estimado que el maíz tendría en promedio un SNP cada 44 pares de bases (Gore et al. 2009). Sin embargo, trabajos comparativos demostraron que, por su alto número de alelos, los SSR son más informativos que los SNP y se requeriría un número de SNP diez veces mayor que de SSR para estudios de estructura poblacional y parentesco (Yu et al. 2009). En este sentido, Yang et al. (2011) genotiparon con SSRs y SNPs 155 líneas endocriadas de maíz de diferentes orígenes y encontraron que los SSR son más informativos en estudios de diversidad, presentando mayores índices de diversidad H_e y PIC. Además los SSRs fueron mejores que los SNPs agrupando las líneas mediante STRUCTURE y PCA así como en estudios de parentesco entre líneas (Yang et al. 2011). Los SSR multialélicos son más informativos que los SNP bialélicos, precisos y poderosos para determinar las distancias genéticas en base a alelos compartidos, debido a que los SSR poseen mayor nivel de polimorfismo. En definitiva, se requiere

un mayor número de SNP que de SSR para lograr la habilidad de los SSR polimórficos para definir las distancias genéticas (Hambling et al. 2007).

En un proyecto integrado por investigadores de CIMMYT, INRA (Francia) y programas de China, India, Indonesia, Tailandia y Vietnam se caracterizaron 140 poblaciones locales de maíz asiático utilizando marcadores SSR, con el fin de determinar la diversidad y estructura genética de las poblaciones y encontrar alelos únicos asociados a genotipos resistentes a la sequía y otros caracteres agronómicos de importancia. Algunas de esas poblaciones poseen probabilidades de contener alelos nuevos y útiles que determinen alta productividad en el maíz en ambientes subóptimos o de recursos limitados. Este es un ejemplo del potencial de la caracterización genética para proveer información que coadyuve a futuros estudios genómicos básicos como mapeos asociativos, con su concomitante utilización en la creación de nuevos cultivares de maíz. A su vez, se genera la información necesaria para el correcto uso y conservación del germoplasma (Prasanna et al. 2010).

Actualmente, la utilización de técnicas moleculares con el fin de potenciar la eficiencia en el mejoramiento se ha convertido en un común denominador en los programas de investigación y mejoramiento de maíz en todo el mundo. El volumen de datos moleculares para diversas poblaciones y líneas de mejoramiento ha crecido tanto en el ámbito público como privado y particularmente en los países desarrollados (Prasanna et al. 2010). Estudios con diversas poblaciones F2 determinaron marcadores SSR que se asociaron a QTLs para rendimiento de grano y resistencia a sequía (Xin-Hai et al. 2003).

Los marcadores SSR no sólo son muy útiles y adecuados para el estudio de la diversidad genética del germoplasma (Liu et al. 2003, Rief et al. 2004) sino que además son idóneos para verificar la identidad e integridad genética de las colecciones en los bancos de germoplasma (Soengas et al. 2009; Chebotar et al. 2003). En este mismo sentido, Börner et al. (2000) sostuvieron que los microsatélites pueden ser utilizados como un sistema de marcadores simple y confiable para verificar la estabilidad genética y la integridad de las accesiones de los bancos de germoplasma. Por su parte, Soengas et al. (2009) mediante el uso de 25 SSR investigó el efecto de la regeneración de tres accesiones de *Brassica oleracea* sobre

su identidad genética, y detectó cambios significativos en la estructura poblacional y en las frecuencias génicas de los loci individuales entre accesiones originales y regeneradas.

En el presente trabajo, el análisis de la diversidad y estructura genética de la colección de 90 accesiones de maíz Blanco Dentado, y el agrupamiento de las accesiones mediante el uso de SSR proporcionará resultados novedosos ya que no se cuenta con caracterizaciones moleculares previas para Uruguay. Asimismo, el estudio de la concordancia entre el agrupamiento mediante SSR y el fenotípico y con la determinación de la diversidad genética incluida dentro de la colección núcleo serán también novedosos, así como la determinación preliminar de grupos dentro del maíz Blanco Dentado. Los resultados obtenidos contribuirán al desarrollo de los programas de mejoramiento, posibilitando mayores progresos genéticos en menor tiempo mediante la explotación de la heterosis entre materiales contrastantes.

1.5.2.2. El método de *bulk DNA fingerprinting* en variedades criollas de maíz

Debido a la naturaleza alógama del maíz, en la mayoría de los casos las accesiones en una colección se componen de semillas pertenecientes a más de 50 individuos. Las estrategias de genotipado de las accesiones en estos casos pueden ser de plantas individuales o a través de *pools* (grupos de plantas de una misma accesión). Dubreuil et al. (2006) encontraron que analizar SSR de *pools* de individuos de una población diversa es más eficiente que genotipar varios individuos por población, y que a su vez es más eficiente que analizar un único individuo por población. La utilización del método “*bulk DNA fingerprinting*” (perfil de ADN masivo) mediante marcadores SSR marcados con fluorescencia, ha sido optimizada para maíz, aumentando la resolución de alelos en poblaciones locales genéticamente heterogéneas (Eschholz et al. 2008).

Cömertpay et al. (2011), de acuerdo a los resultados obtenidos en su estudio, sugirieron que el análisis de muestras en *bulk* de ADN es rápido, eficiente, ahorra trabajo y tiene menor costo que el muestreo individual. Estos autores, en efecto, afirmaron haber tenido éxito en la determinación de la diversidad genética y en las

relaciones genéticas entre variedades locales. En este sentido, Eschholz et al. (2008) en un estudio comparativo de determinación de diversidad genética en poblaciones locales de maíz con muestras en *bulk* y muestras individuales, aseguraron que el método de *bulk* es viable y sugirieron la utilización de SSR con cuatro o más bases en sus motivos de repetición a los efectos de evitar el tartamudeo y la detección de alelos irreales. Eschholz et al. (2008) sugieren que los *bulk* de cada población sean integrados como máximo por 20 individuos con el fin de lograr precisión en el análisis.

1.6. REGENERACIÓN DE ACCESIONES DE MAÍZ EN COLECCIONES *EX SITU*

Aunque la conservación de las accesiones en los bancos de germoplasma es considerada muy estable, la posibilidad de cambios a nivel genético con la concomitante pérdida de identidad genética de las accesiones durante las regeneraciones es real, sobre todo cuando en la colecta se tomó un tamaño de muestra no representativo de la variabilidad que existía *in situ*. Durante la regeneración, la pérdida de identidad genética puede estar dada por desaparición de variantes alélicas debido a la acción de la deriva génica o selección negativa (en contra de determinadas variantes alélicas) causada por el ambiente de regeneración. Las diferencias en la adaptabilidad de las semillas y problemas en la germinación y establecimiento de las plántulas son las causas que a menudo imponen desafíos adicionales a la correcta realización de las regeneraciones (Taba y Twumasi-Afriyie 2008). Además, la pérdida de identidad genética en las regeneraciones con respecto a las accesiones originales puede ocurrir debido a la llegada de polen foráneo en el momento de floración de las accesiones en regeneración.

La multiplicación y regeneración de las accesiones es inevitable ya que se debe cumplir con las demandas de semillas de los investigadores con fines de caracterización y uso del germoplasma en programas de mejoramiento. Así como también con la demanda de semilla para la reinsertión de las accesiones a su cultivo *in situ* por solicitud de los productores, cumpliendo así con los objetivos de los bancos de germoplasma. La regeneración de las accesiones de maíz con fines de

conservación se debe realizar cuando la viabilidad de las semillas sea inferior al 85%, o en los casos en que la muestra total de una accesión no supere las 1500 semillas (Taba et al. 2004).

Más allá de las precauciones que se tomen en la regeneración, este proceso es potencialmente propenso a generar cambios genéticos en las accesiones debido a los cuellos de botella a nivel del número de individuos que dan descendencia para la próxima generación (deriva genética), las mezclas no intencionales de materiales y la contaminación con polen no deseado (Crossa et al. 1994). El ambiente en el que se realiza la regeneración puede ejercer selección natural, y constituye otra causa de cambios en las frecuencias génicas de una accesión (Reedy et al. 1995). Las mutaciones potenciales que pueden ocurrir en el pasaje generacional de originales a regeneradas producirían cambios en las variantes alélicas presentes y en las frecuencias génicas entre ambas generaciones de una misma accesión (Schlötterer 2000).

Wen et al. (2011) compararon el nivel de integridad genética en 20 variedades locales de maíz conservadas y regeneradas en cinco bancos de germoplasma. Mediante marcadores moleculares SNP, se encontraron cambios en la pureza genética de las accesiones en términos de pérdida de alelos con respecto a las accesiones originales, y la presencia de alelos no parentales en las accesiones originados, siendo los alelos nuevos originados por contaminación indeseada en la regeneración (Wen et al. 2011) o por mutaciones (Schlötterer 2000).

Una comparación mediante marcadores RAPDs de la muestra original de dos accesiones de la colección núcleo de la raza Blanco Dentado colectadas en Uruguay con sus regeneraciones en CIMMYT (México), mostró un 7% de diferencia en las frecuencias alélicas entre las muestras originales y las regeneradas (Malosetti et al. 1999). Los autores atribuyen estas diferencias a efectos del muestreo, aunque la regeneración se realizó en un ambiente distinto, y puede estar confundido con el efecto de la selección natural sobre la diversidad genética. La comparación de una regeneración realizada localmente con la regeneración realizada en CIMMYT permitiría aislar el efecto “muestreo” del efecto “ambiente de regeneración”.

En el presente trabajo se utilizaron siete accesiones regeneradas en Uruguay, en CIMMYT y las originales para analizar la fidelidad genética de las accesiones regeneradas. Los resultados obtenidos contribuirán a evaluar las estrategias de conservación actuales del germoplasma, sentar bases para una conservación eficiente determinando si los procesos de regeneración permiten el mantenimiento de la identidad en las poblaciones regeneradas, y si existe incidencia del ambiente de regeneración en el mantenimiento de la identidad genética de las accesiones.

1.7. OBJETIVOS

1.7.1. Objetivo general

Determinar la diversidad y estructura genética presente en la colección de 90 accesiones de la raza Blanco Dentado conservadas *ex situ* en el Banco de germoplasma de INIA La Estanzuela mediante microsatélites, analizar si la colección núcleo establecida en base a datos fenotípicos puede ser validada mediante marcadores moleculares, y analizar la integridad genética de siete accesiones regeneradas en México (CIMMYT) y Uruguay.

1.7.2. Objetivos Específicos

1. Determinar la diversidad presente en la colección de Maíz Blanco dentado así como la diversidad dentro de cada una de las 90 accesiones a través del número de alelos por locus (A), el número efectivo de alelos (A_e), el porcentaje de loci polimórficos (%P), la heterocigosis esperada (H_e), y la distribución de las frecuencias alélicas dentro de las accesiones. Además, evaluar la informatividad de los marcadores SSR mediante el índice PIC (*Polymorphism Information Content*).
2. Determinar la estructura genética de la colección Blanco Dentado a través del índice de partición de la varianza genética G_{ST} (varianza entre accesiones) y $1-G_{ST}$ (varianza dentro de accesiones). Determinar el agrupamiento de accesiones mediante Ward y abordaje Bayesiano, ambos basados en las frecuencias génicas intrapoblacionales.

3. Validar si la colección núcleo de la raza Blanco Dentado, establecida previamente en base a datos fenotípicos, presenta suficiente representatividad de la diversidad y estructura encontrada en la colección base de la Raza Blanco Dentado mediante marcadores microsatélites.
4. Comparar la integridad genética en las muestras originales con sus respectivas regeneraciones en México y Uruguay en siete accesiones de maíz Blanco Dentado de la colección uruguaya.

1.8. PREGUNTAS DE LA INVESTIGACIÓN

- Preguntas asociadas al objetivo específico 1

Determinar la diversidad en la colección de Maíz Blanco dentado así como la diversidad dentro de cada una de las 90 accesiones y evaluar la informatividad de los marcadores SSR.

- ¿Los microsatélites elegidos para el genotipado de las accesiones son lo suficientemente informativos para determinar la diversidad y estructura de la colección Blanco Dentado de maíz?
- ¿Cuán diversa es la colección en comparación con otros estudios realizados con una única raza? ¿Y específicamente con respecto a otras colecciones de la raza Blanco Dentado? ¿Y en comparación con los índices obtenidos en estudios con más de una raza?

- Preguntas asociadas al objetivo específico 2

Determinar la estructura genética de la colección Blanco Dentado y determinar el agrupamiento de accesiones mediante análisis basados en las frecuencias génicas intrapoblacionales.

- ¿Cómo se particiona la variabilidad entre y dentro de las accesiones en la colección de la raza Blanco dentado?

- ¿Cómo se agrupan las accesiones de acuerdo a su similitud o distancia genética? ¿Es posible determinar los grupos más diferenciados, con mayor potencial como grupos heteróticos preliminares?
 - ¿Cuán diversas son las accesiones de maíz Blanco Dentado en comparación con otros estudios realizados para una única raza, sea en el centro de origen o sea en centros de diversidad secundarios como Uruguay? ¿Y en comparación con estudios con más de una raza?
 - ¿Cómo se distribuyen las frecuencias alélicas dentro de las 90 accesiones? ¿Predominan los alelos exclusivos, con baja frecuencia, o predominan los alelos con alta frecuencia o alelos fijados? ¿Las frecuencias génicas están equilibradas?
 - ¿Existen alelos únicos (presentes en una única accesión)? ¿Cuántos? ¿Qué accesiones los poseen?
 - ¿El agrupamiento genético de las accesiones, mediante marcadores SSR, se correlaciona con las distancias geográficas entre las accesiones?
 - ¿Existe(n) característica(s) fenotípica(s) asociada(s) con el agrupamiento genético de las accesiones obtenido mediante marcadores SSR?
- Preguntas asociadas al objetivo específico 3
- Evaluar si la colección núcleo de la raza Blanco Dentado, establecida previamente en base a datos fenotípicos, tiene representatividad de la diversidad y estructura de la colección analizada con marcadores SSR.*
- ¿Cuál es la proporción de la variabilidad genética presente en la colección núcleo con respecto a la variabilidad genética de la colección base? ¿La colección núcleo y la colección base presentan índices de diversidad similares?
 - ¿Qué cobertura de clases alélicas captura la colección núcleo con respecto a la colección base?

- ¿Representa la colección núcleo la estructura genética de la colección base obtenida en base a marcadores SSR, en cuanto al número de accesiones observadas y esperadas para cada grupo genético en la colección base?
- Preguntas asociadas al objetivo específico 4
- Determinar la integridad genética de siete accesiones regeneradas en México y en Uruguay en comparación con las originales.*
- ¿Las accesiones luego de la regeneración presentan el mismo repertorio y frecuencias alélicas que en sus accesiones originales respectivas? ¿Se mantienen los mismos alelos y sus frecuencias génicas en cada población original y sus regeneraciones?
 - ¿Las accesiones regeneradas en México presentan la misma diversidad genética que las regeneradas en Uruguay? ¿Existe incidencia del ambiente en las frecuencias génicas, o en la pérdida de ciertos alelos?

2.

GENETIC DIVERSITY AND STRUCTURE IN THE URUGUAYAN WHITE DENT MAIZE GERMPLASM USING MICROSATELLITES (SSR) MARKERS³

2.1 ABSTRACT

This research aims to study the genetic diversity and structure of the Uruguayan White Dent maize collection (*Zea mays* L) and evaluate the representativeness of its core collection previously defined by phenotypic traits. Ninety accessions were fingerprinted using 26 SSR markers. Genetic diversity was assessed by diversity indexes and genetic structure by G_{ST} index. All SSR markers were polymorphic for the collection ($PIC = 0.532$), with a mean number of alleles $A = 7.43$, effective alleles $A_e = 3.04$, and expected heterozygosity $H_e = 0.579$. The estimated proportion of genetic variation between accessions (G_{ST}) was 0.251, and therefore variation within accessions was 0.749. The collection grouped in four significantly different groups following Ward clustering, based on Modified Rogers distances, Canonical, and Bayesian approach. The core collection was representative of the base collection, even when genetic distances were not correlated with morphological distances. The core collection had accessions within the four clusters with no difference between the number of observed and expected entries per group according to Fisher test. The class coverage was 82.14. The core and base collections did not differ in H_e , A_e , %P, A, H_s , containing the maximum of diversity with a minimum of redundancy. In addition, this research evaluated genetic integrity of seven accessions with its regenerations in Mexico and Uruguay, through Euclidean distances and significant differences detected by Fisher exact test for the SSR allelic frequencies. Most regenerations (9/14) preserved genetic integrity of original accessions. In other cases,

³ Este capítulo sigue el formato requerido por la revista "Genetic Resources and Crop Evolution". A ser publicado como: Porta et al. *Genetic diversity and structure in the Uruguayan collection of white dent maize using microsatellites (SSR) markers*.

lose or appeared alleles were the main reason for genetic differences, and the regeneration procedure could not be satisfactory. Genetic diversity data in combination with morphological data in the White Dent maize collection from Uruguay helps on its conservation and use in breeding programs.

Key words core collection, *ex-situ* collection, landraces, lowlands maize, regeneration integrity, *Zea mays* L.

2.2 INTRODUCTION

Uruguay historically and still has a significant genetic diversity of maize (*Zea mays* L.) landraces conserved *in situ - on farm* by farmers (Berretta et al. 2007, Porta et al. 2013). An *ex situ* maize collection of 852 accessions was led by Prof. De León at the College of Agronomy, Universidad de la República in 1978 (De María et al. 1979). This work implied the collection of landraces in the farmers' fields all over the Uruguayan territory within the framework of the Latin American Maize Project (Salhuana et al. 1998). The Uruguayan collection of maize was firstly conserved at INTA Castelar germplasm bank in Argentina. Then, accessions were repatriated to Uruguay in 1997 and kept at INIA La Estanzuela germplasm bank. Currently, the Uruguayan maize collection has also a complete copy conserved at CIMMYT's maize germplasm bank in Mexico (mgb.cimmyt.org/gringlobal/search.aspx). Accessions have been regenerated in both germplasm banks.

The 852 maize accessions of the Uruguayan collection were classified into ten maize racial types on the basis of phenotypic traits such as grain, cob and plant traits (De María et al. 1979, Fernández et al. 1983, Gutiérrez et al. 2003). The diversity given by the number of maize races maintained by farmers in some regions in Uruguay at that time was comparable to the high diversity found in regions of Bolivia and Paraguay where maize was grown from ancestral times (Vilaró 2013).

Malosetti and Abadie (2001) designed a core collection within the Uruguayan maize collection based on phenotypic traits, applying the logarithm strategy (Brown 1989) and the method of Relative Diversity (Diwan et al. 1995). Both methods were applied after a multivariate analysis and stratified selection which ensured the

maintenance of maximum diversity with a minimum of redundancy. The core collection resulted in 90 of the 852 accessions.

In the Uruguayan maize collection, the accessions belonging to White Dent race were considered as a superior material for silage production due to the high biomass yield (Abadie et al. 1997). Salhuana et al. (1998) analysed the breeding potential of maize accessions from Argentina, Chile, Uruguay and United States of America (US), and identified four Uruguayan accessions with high combinatory aptitude with three topcross materials relevant for the US maize breeding industry, three of them belonging to the Uruguayan White Dent race.

Plant breeding efforts based on the White Dent collection included a selection from the racial compound bred at the University and resulted in the open pollinated cv. 'Blanco Cangué' released in 1997 (Ceretta et al. 1997, Vidal et al. 2009). Cultivar 'Blanco Cangué' has adaptation to diverse yield potential environments, and is suitable for silage as for direct grazing because has a great ability for re-sprouting. This White Dent cultivar showed also high nutritional quality expressed through the metabolisable energy and net energy of lactation (Vidal et al. 2009).

The Uruguayan core collection of maize comprised a total of 90 accessions, 17 of which corresponded to the White Dent race (Malosetti and Abadie 2001). Ozer Ami et al. (2004), on the basis of phenotypic traits from Fernández et al. (1983), confirmed specifically the core collection for White Dent race. The designed White Dent core collection contents 18.8% of the total Uruguayan White Dent accessions (90). The relatively high proportion of accessions in the core set is due to the high phenotypic variability, and therefore a major number of accessions than usual was needed to represent the variability found within White Dent race (Ozer Ami et al. 2004). Additional characterization and evaluation of the accessions could improve the design of the core collection (Malosetti & Abadie 2001). Until the present study, the collection was not characterized by molecular markers.

Uruguayan core collection was made with the purpose of maximising the representativeness of the genetic diversity in terms of plant breeding (Marita et al. 2000). In this type of collection, each entry of the whole collection is represented by

an accession in the core subset, and results in a multipurpose core (Odong et al. 2013). The quality of the core collection should be evaluated on the basis of traits differing than those used for the design (van Hintum et al. 2000).

Molecular characterization of germplasm collections is a useful tool for management and studying genetic diversity since the determination of available genetic variability and the genetic structure of the collection would help breeding programs in the introduction and use of germplasm (Charcosset and Moreau 2004). The knowledge on genetic variation and genetic similarities among accessions would permit the selection of priority accessions for conservation and estimate putative genetic diversity losses in germplasm collections. Another use of molecular markers include the evaluation of the integrity of conserved accessions when subjected to the process of regeneration (Börner et al. 2000, Soengas et al. 2009, Wen et al. 2011).

Microsatellites or simple sequence repeat (SSR) are codominant, robust markers well adapted to the analysis of DNA pooled-sampling or bulk strategies (Dubreuil et al. 1999, 2006, Reif et al. 2005a). The method has been implemented in several maize genetic diversity studies (Eschholz et al. 2008, Warburton et al. 2010, Sharma et al. 2010, Cömertpay et al. 2012, Bedoya et al. 2017). This bulk strategy yields a good correlation of estimated allele frequencies between bulk and individual samples ($r = 0.85$) (Reif et al. 2005a, Bedoya 2012).

Hambling et al. (2007) compared SSR markers with SNP, which are currently very used because of their adaptation to massive screening genome techniques and the low cost. SSR are more powerful than SNP in measuring genetic distances, on the basis of shared alleles, due to the large series of alleles found for each SSR locus. A larger number of SNP will be required to reach a similar ability to define genetic distances than using polymorphic SSR (Hambling et al. 2007, Yu et al. 2009, Yang et al. 2011).

This research aimed to analyse the genetic diversity and structure of the Uruguayan White Dent maize accessions using a DNA pooled-sampling strategy with microsatellites (SSR). Besides, we evaluated the representativeness of the White Dent core collection, previously selected on the basis of phenotypic traits; and we

monitored the genetic identity in seven accessions regenerated in Uruguay and in CIMMYT (Mexico) in comparison with the originals.

2.3 MATERIALS AND METHODS

2.3.1. Plant material

The ninety maize accessions of the White Dent race from the Uruguayan collection (De María et al 1979, Fernandez et al. 1983) were utilized in the present work (listed in Supplemental material S1) to perform the genetic characterization. Seed samples were obtained from the germplasm bank at INIA La Estanzuela (Uruguay), and correspond to the regeneration carried out between 1997 and 2000 at La Estanzuela, Uruguay (Lat 34°20'24" S, Long 57°41'39" W).

In parallel, 7 accessions were also genetically characterized and compared using seed samples from two additional sources, and therefore, three origins were compared for these seven accessions (accession codes in Supplemental material S2). The additional seed samples were from (1) the original seed collected in 1978, without any regeneration, obtained from the INIA La Estanzuela germplasm bank, and (2) from a regeneration carried out at CIMMYT (Mexico) requested to the CIMMYT germplasm bank. A seed lot of an original accession or regeneration will be also referred as a 'population' in this research.

2.3.2. DNA isolation in bulks

In order to perform DNA isolation, 50 random seeds of each accession were grown in a greenhouse. Two 15 individuals bulks per accession were made (Warburton et al. 2010, Prasanna et al. 2010). Circular leaf pieces, of one centimetre in diameter, were sampled from leaves of the same age, from each of the 15 seedlings, aiming to extract balanced quantities of DNA (Dubreuil et al. 2006). Leaf pieces were stored at -80 °C until lyophilisation. DNA extraction was performed using the modified CTAB method described by CIMMYT (2005), which was designed specifically for extraction of maize DNA from bulk samples.

2.3.3. SSR markers, amplifications and fragments analysis

The selected SSR markers have three to six bases in their repeat motifs to avoid stuttering observed with shorter repeats and to improve the efficiency in the detection of polymorphisms (Sharma et al. 2010). The selected SSR loci have been used previously by Dubreuil et al. (2006), Cömertpay et al. (2011), Warburton et al. (2010), Bedoya et al. (2017) following the 'bulk DNA fingerprinting' approach for the characterization of maize landraces and open-pollinated varieties. An initial set of 41 SSR markers were selected from the Maize GDB database (www.maizegdb.org), aiming to cover through the maize genome (Supplemental Material S3), and 34 markers of these were successfully implemented and resulted polymorphic in the studied populations. Polymerase chain reactions (PCR) and fragment analysis of PCR products were done according to the protocols from CIMMYT (2005). Finally 26 SSR markers with minimum missing data were used for data analysis (Supplemental material S3).

Amplifications were performed using M13-labelled SSR (Schuelke 2000). Primers were labelled with fluorescent dyes 6-FAM and HEX (Blacket et al. 2012), and protocols with gradient temperature were applied using thermocyclers Eppendorf®. The standard programme for PCR reactions were 1 cycle of 1 min at 93 °C, followed by 30 cycles of 30 sec at 93°C, 1 min at the annealing temperature for the specific pair of primers (x in Supplemental Material S3), and 1 min at 72 °C, and a final cycle of 5 min at 72 °C. Besides, touchdown PCR were performed to decrease stutter in those SSR primers not fitting well by adjusting annealing temperature, with an initial cycle of 2 min at 94 °C, 7 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at the annealing temperature for the specific pair of primers (y in Supplemental Material S3, reducing one degree per cycle), and 1 min at 72 °C, followed by 35 cycles with 1 min at 94 °C, 1 min at the annealing temperature for the specific pair of primers (z in Supplemental Material S3), and 1 min at 72 °C, and a final cycle of 5 min at 72 °C. Products from PCR reactions were quantified by Nano Drop spectrophotometer (Thermo Scientific Nanodrop) and appropriately diluted for detection in automated sequencer. Samples were prepared in formamide (<http://dna-analysis.research.yale.edu/microsatellites>),

and fragments were subsequently analysed in automatic sequencer ABI3730xl 96-Capillary Genetic Analyzer (Applied Biosystems®) at the University of Yale (US). Electropherograms were analysed using Peak Scanner™ v.1.0 (Applied Biosystem®). SSR alleles were determined in base pairs (bp) according to the fragment sizes and peak height. Regarding the high similarity between the two bulks from the same accession in preliminary runs, the 104 populations (90+7+7) were genotyped using only one bulk per accession.

Data obtained in Peak Scanner were prepared in Excel sheets and submitted to the program FreqsR (Franco et al. 2005) on the platform R (R Development Core Team 2013) to determine the allele frequencies in each population calculated on the basis of peak heights (Franco et al. 2005, Dubreuil et al. 2006, Bedoya et al. 2017).

2.3.4. Genetic diversity and population structure

Informativeness of SSR markers in the collection was described using the polymorphic information content (PIC) using the software by Nagy et al. (2012). For each accession, genetic diversity was characterized by the average number of alleles per locus (A), the effective number of alleles (A_e), expected heterozygosity within each population (H_e), and the number and frequency of unique alleles (Berg et al. 1997) using Power Marker 3.25 (Liu et al. 2005). Total heterozygosity (H_T) was calculated for the whole collection, as:

$$H_T = 1 - \sum \bar{p}_i^2$$

where p_i is the average frequency for each allele calculated throughout the collection as a pool. The within accession allele frequencies were used to estimate average heterozygosity within accessions (\bar{H}_S), which was calculated as H_e within accessions averaged on the number of accessions. The genetic variation between accessions was estimated as $D_{ST} = H_T - \bar{H}_S$ (Berg et al. 1997). The G_{ST} index (Nei 1982) for the collection was estimated as the ratio between the genetic diversity between accessions (D_{ST}) and the total genetic diversity (H_T):

$$G_{ST} = \frac{D_{ST}}{H_T}, \quad 0 \leq G_{ST} \leq 1$$

Then G_{ST} values were averaged over all polymorphic loci to estimate population (accessions) divergence. A G_{ST} value of 0.05 means that 95% of total genetic diversity resides within populations and 5% resides among populations (Berg et al. 1997). All alleles in the White Dent collection were used in the calculation of H_T and \bar{H}_S and, thus, G_{ST} may be regarded as a multiallelic variant of Wright's F_{ST} (Berg et al. 1997).

Genetic distances between accessions, based on allele frequencies within accessions, were calculated using the Modified Rogers distance, d_w (Wright, 1978, Goodman and Stuber 1983), which is especially suitable in studies based on allelic informative marker data for examining the prediction of heterosis through genetic dissimilarities or the establishment of heterotic groups (Reif et al. 2005b). This matrix was used to hierarchically cluster accessions using the Ward method of minimum variance (Ward 1963). The significance of the formed groups was tested by the F_{ST} between groups, calculated by AMOVA, against percentile 99 using 1000 Felsenstein permutations (Franco et al. 2001). Genetic structure of the collection was also explored through a canonical analysis, based on of the allelic frequencies of the accessions, using InfoStat professional version (Di Rienzo et al. 2012)

In addition, STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) was used to infer the collection structure and the level of admixture between populations. As STRUCTURE does not accept allele frequencies from bulks, bulk frequencies per accession were used to simulate the multiloci haploid genotype for 30 gametes per accession using an *ad hoc* designed program. Each run in STRUCTURE used a burn-in-length of 10000 with 100000 Markov Chain Monte Carlo replications, assuming that allele frequencies were independent between populations. Optimal number of clusters (k) was determined simulating k from 1 to 17 and plotting k (X-axis) versus Evano's Δk (Evano et al. 2005) calculated from the $\Pr(X/k)$ or $\text{LnP}(D)$ values provided by Structure Version 2.3.4 (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2003).

2.3.5 Genetic structure and association with phenotypic data and geographic origin

A phenotypic assessment of the 90 accessions of the White Dent maize collection was performed at the Centro Regional Sur experimental field (Lat -34.61; Long -56.22) (Progreso, Canelones) in South Uruguay. The trial was planted on December 18, 2013 and harvested in May 2014 using an Alfa-Lattice experimental design with three replicates per accession, and twenty plants per plot. At least eight plants of the center of the plot were evaluated. Phenotypic traits comprised days to tassel (50% of plants with pollen shed), accumulated degree-days to tassel, tiller number per plant, secondary tillers percentage, cob number per plant, plant height (cm), ear insertion height (cm), and the ratio between plant and ear insertion heights. Post-harvest evaluations comprised weight of cobs per plot (g), cob average weight, cob diameter (cm), cob length (cm), cob row number, kernels per row number, and cob worm and fungal diseases incidence. The Gower (1971) distances were used to build a phenotypic distance matrix between accessions with 15 evaluated traits. A Mantel test was applied to estimated correlation between genetic distances (Roger's modified distances) and phenotypic distances (Gower distances). In order to check associations between the genetic structure (Ward groups) and the phenotypic traits, significant differences among Ward groups were tested for each individual trait by ANOVA, considering Ward groups as treatments and accessions within groups as repetitions. For traits with significant association with genetic structure, a restricted test of Fisher (LSD) was applied.

Geographic distances between accessions were calculated using DIVA-GIS (Hijmans et al. 2001), based on the geographical references in decimal system for the landraces collection's sites determined from passport data (Supplemental material S1). In order to check correlations between genetic and geographical distances between accessions we made a Mantel test using Past v. 2.17c (Hammer et al. 2001).

2.3.6. Core collection representativeness

In the present study the representativeness of the core collection, previously defined (Ozer Ami et al. 2004), was analysed for the SSR data obtained in this research through confidence intervals for the main diversity indexes (A, Ae, He, Hs), and the coverage index (Odong et al. 2013).

In addition, the representativeness of the core collection in the genetic structure (determined by the Ward procedure) was checked using Fisher exact probability test. The observed number of core accessions within a Ward group was tested against the expected relative frequency for the group (ERF_{WG}), regarding the size of the Ward group and the proportion of the core set in the white dent collection (18.8%) (Ozer Ami et al. 2004), as $ERF_{WG} = Nr$ of accessions in the Ward group \times 0.188.

2.3.7 Comparing original accessions and regenerations

Seven original accessions and its regenerations in Uruguay and Mexico were clustered through Euclidean distances, suitable in studies based on allelic informative marker data (Reif et al. 2005b), based on the SSR allele frequencies. Besides, the diversity indexes A and He were estimated for each accessions and its regenerations.

The number of alleles shared between an accession and its regenerations was analysed, determining alleles shared by the three populations, shared by two populations and unique alleles. The significance of genetic differences for individual loci was tested by Fisher exact probability test (Metha et al. 1984). In order to that, the allelic frequencies at each locus were expressed as the estimated number of gene copies in the bulk sample, and the null hypothesis was rejected at $p \leq 0.01$ using 12 SSR markers with no missing data for these seven accessions and their regenerations.

2.4 RESULTS

2.4.1. Genetic diversity

A total of 193 alleles from 26 SSR were found for the 90 accessions of the White Dent race, which resulted in 7.43 average alleles (A). The mean PIC was 0.532 (minimum 0.024; maximum 0.882) (Supplemental Material S3). Expected heterozygosity in the Uruguayan White Dent maize collection (Ht) was 0.579, and the number of effective alleles (Ae) was 3.04.

The average number of alleles per locus (A) within accessions was 2.92 (range 2.12 to 3.52), the average number of effective alleles (Ae) within the accessions was 1.79, the average percentage of polymorphic loci within accessions was 84.4% (range 60 to 95.8%), and the expected heterozygosity within accessions (Hs) averaged 0.44 (range 0.32 to 0.54). When an allele was present (frequency > 0), average allele frequencies within accessions showed predominantly values below 0.5, with a modal frequency of 0.15 (Fig 1a). Only six of the 193 alleles showed within accessions average frequencies above 0.70 (Fig 1a).

Common alleles present in 81 to 90 accessions were 11.4% (22/193 alleles) (Fig 1b). Rare alleles represented 32.6% (63/193) and were found in less than ten accessions (Figure 2a). Among these alleles, 18 were private alleles, as appeared in only one accession (Supplemental material S4). For these 18 private alleles, the frequency within accession was predominantly below 0.10 (13/18), intermediate in 3/18 accessions and nearly fixed in 2/18 accessions.

Some accessions stood out for the carried number of rare alleles. Two accessions (URZM 3002 and URZM 11008) had nine of the 63 alleles, and three accessions (URZM 16001, URZM 1003, and URZM 11006) had six of these 63 alleles (Supplemental material S4b).

Averaged G_{ST} index was estimated in 0.251 (range from 0.109 to 0.444 for phil15 and umc1304 SSR markers respectively). This means that 25.1% of the total genetic diversity in the Uruguayan White Dent maize collection resided between accessions, while the 74.9% resided within accessions.

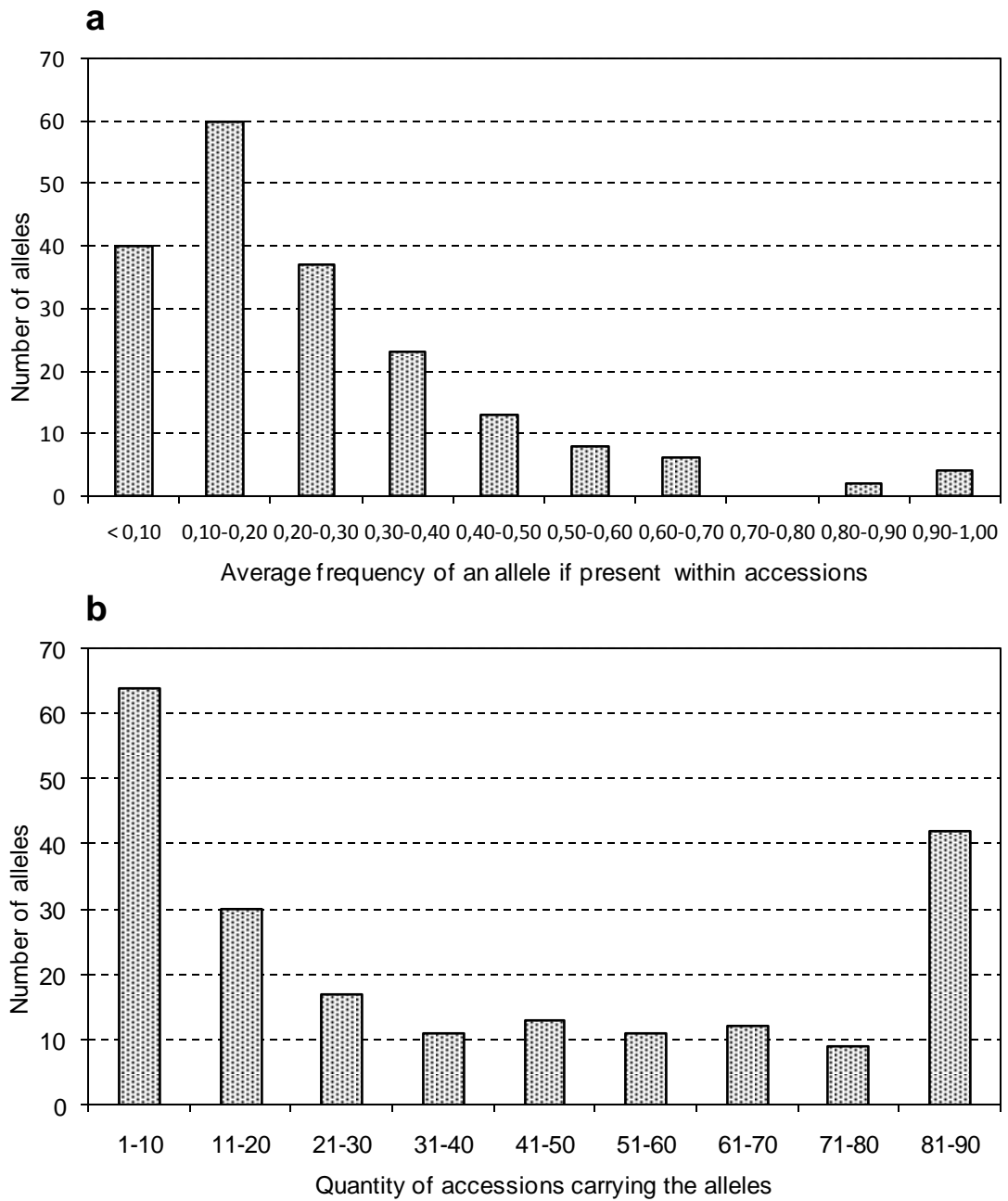


Fig 1 (a) Number of alleles in function of the average frequency within accessions when the allele was present in an accession **(b)** Distribution of the 193 SSR alleles as a function of the number of accessions carrying an allele

2.4.2. Genetic structure of the collection

The 90 White Dent maize accessions clustered in four groups after the cluster analysis based on Modified Roger distances and the canonical analysis, and the Bayesian approach recognized four genetic backgrounds (Fig 2 and Fig 3).

The expected heterozygosity between the four groups based on the Modified Rogers Distance and the Ward algorithm was 0.0299, mean expected heterozygosity within the same groups was 0.5573, and the index of fixation Fisher Wright (F_{ST}) was estimated in 0.051, a significant value regarding that percentile 99 throughout 1000 Felsenstein permutations which yielded 0.022. Canonical and Ward clustering analyses are coincident in identifying the number of groups as well as the more distant groups (Fig 2 and Fig 3). Group 1 is the more distant from the rest, followed by group 2, meanwhile, groups 3 and 4 are weakly differentiated between them. Considering accessions within each group, the Canonical and Ward approaches are totally coincident with the exception of three accessions situated out of the confidence interval for group 4 (Figure 3).

Based on Evano et al. (2005) in the Bayesian approach (Supplemental material S5), four genetic backgrounds ($K=4$) were defined as the optimal number of groups for the Uruguayan White Dent collection (Fig 2b).

Genetic structure of the White Dent maize collection based on SSR alleles was not related to geographical distances between accessions collection points (Mantel correlation: -0.0271 , no significant).

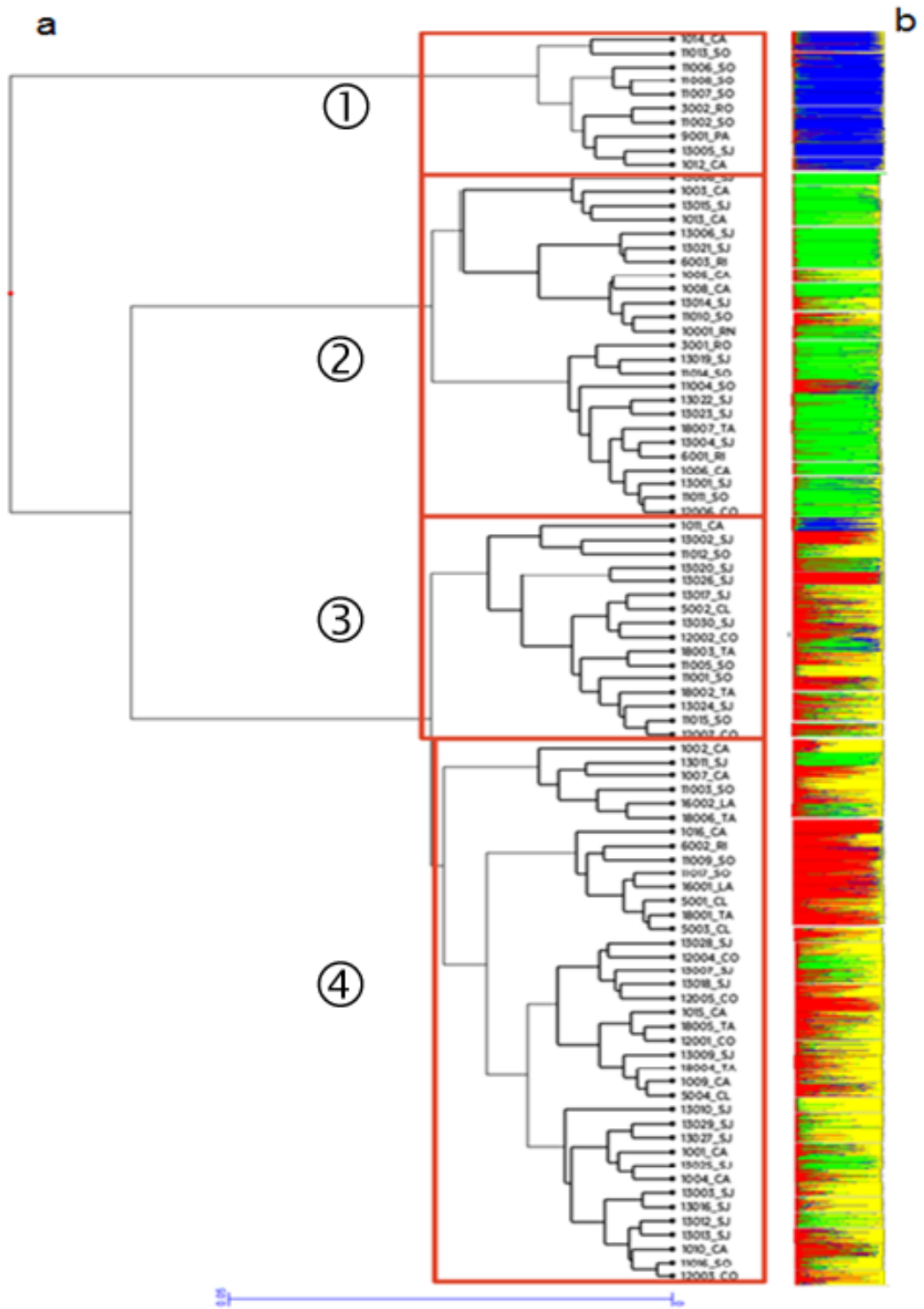


Fig 2 (a) Dendrogram of the Uruguayan White Dent collection of maize using Ward cluster analysis of minimum variance on the basis of Modified Roger Distance

(MRD), different groups enumerated from 1 to 4 ranked according to MRD. **(b)** Genetic structure according to Bayesian approach, with optimal k set to 4 according to Evanno et al. (2005), represented by four colours (blue, green, yellow and red). Each accession is represented by 30 horizontal lines (gametes), lines are partitioned into coloured segments that represent the gamete estimated membership with the four genetic backgrounds. Accessions labels are shown in the dendrogram

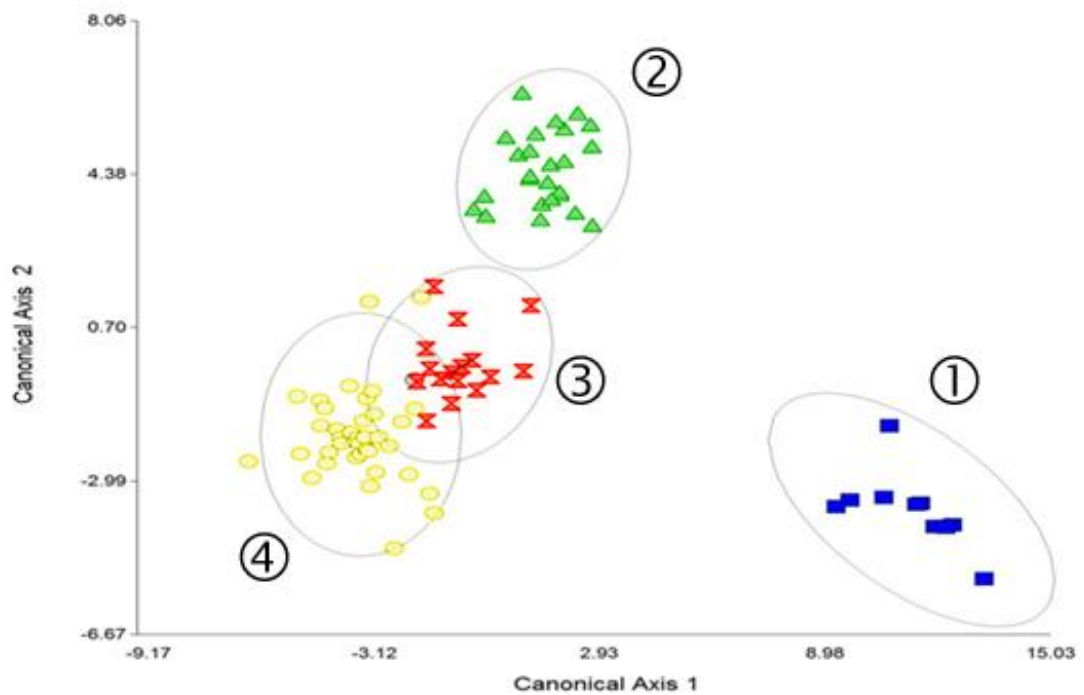


Fig 3 Biplot for canonical analysis of the 90 White Dent maize accessions considering the genetic frequencies of the 193 SSR alleles. Four groups are distinguished by colours and circles represent confidence intervals for $p = 0.05$. Numbers 1 to 4 indicate the analogy for this groups with the Ward groups.

2.4.3. Genetic structure and association with phenotypic data and geographical origin

The correlation between genetic distances and phenotypical distances (Gower distances based on 14 phenotypical variables evaluated in 2014) were -0.0626 ($P < 0.01$ based on MCMC permutations).

All phenotypical variables showed significant differences between accessions, with the exception of the number of cobs per plant. However, regarding the accessions as replications within the four clusters defined by the Ward analysis, most phenotypical traits were not associated with the genetic structure, except for the weight of cobs per plot and the number of tillers per plant (Fig 4). Group 1 yielded a higher weight of cobs per plot significantly different to group 3, whereas group 4 presented a larger number of tillers per plant significantly different to group 2 (Figure 4).

Eight of the fifteen variables measured in 2014 (days until tassel, plant height, cob height in the plant, number of tillers, number of cobs per plant, cob length, cob diameter and number of rows per cob) were also variables evaluated in 1979. All of these variables showed significant Pearson correlation ($p=0.05$) between the evaluations made in 1979 and 2014, with the exception of the number of cobs per plant and cob length. The significant correlations ranged from 0.24 for cob diameter to 0.53 for number of rows per cob.

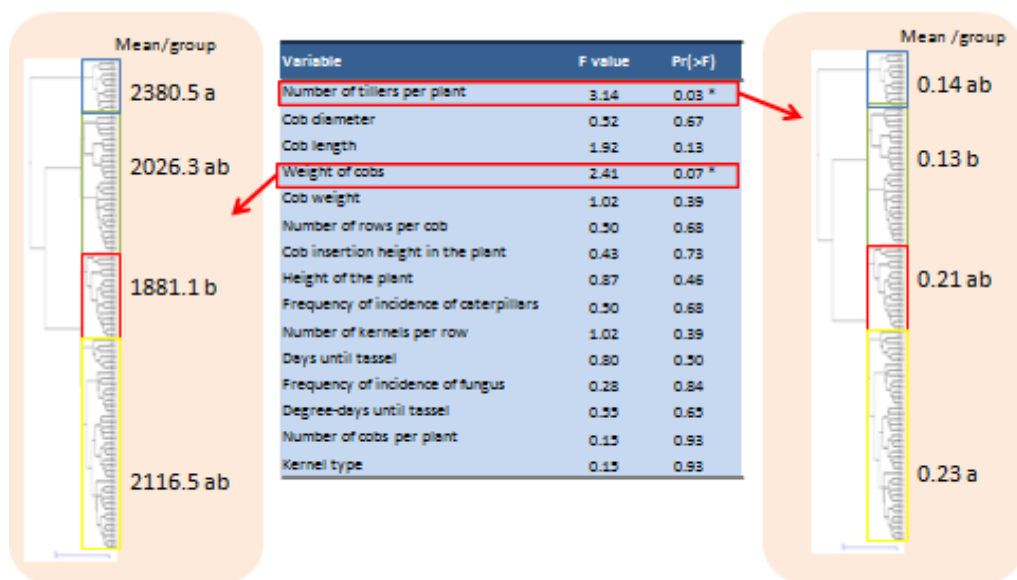


Figure 4 Statistical association between phenotypical variables and the four Ward genetic groups in the White Dent maize collection (Ward groups within different colour rectangles: Group 1 blue , Group 2 green, Group 3 red and Group 4 yellow). Significant differences between means of the Ward groups were found for the weight

Table 2 Diversity indexes for the base collection (90 accessions) of the Uruguayan White Dent maize and the core collection (17 of the 90 accessions -entries-)

Collection	He ^a		(Ae) ^a		Hs ^b		%P ^c		(A) ^c	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	Range	Mean	Range	Mean	Range
Base collection	0.579	0.041	3.04	0.345	0.442	0.308–0.536	84.40	60.00–95.83	2.92	2.12–3.52
Core collection	0.584	0.041	3.03	0.323	0.449	0.397–0.493	84.35	70.83–95.45	2.93	2.48–3.27
CI ($\alpha= 0.05$)	0.499–0.660		2.36–3.71		0.434–0.451		82.95–85.85		2.86–2.97	

^a (He) mean expected heterozygosity and (Ae) number of effective alleles considering the allelic frequencies in the collections as a whole;

^b (Hs) mean expected heterozygosity within the accessions (each accession as a subpopulation within the base or core)

^c (%P) mean percentage of polymorphic loci and (A) mean alleles per locus, within-accession indexes for the 90 and 17 accessions

Table 3 Mean number of alleles per locus (A) and expected heterozygosity (He) in seven original White Dent accessions and regenerations carried out in México and Uruguay, and the correspondent confidence intervals for the diversity indexes for each accession

Population	Accessions													
	11004		11006		12001		12006		13004		13005		13007	
	A	He	A	He	A	He	A	He	A	He	A	He	A	He
Original	3.67	0.56	3.25	0.53	3.33	0.49	3.08	0.53	3.17	0.51	2.92	0.52	3.58	0.56
Regenerated in México	3.58	0.55	3.33	0.53	3.33	0.52	3.25	0.45 ^b	3.42	0.53	3.08	0.50	3.58	0.56
Regenerated in Uruguay	2.92	0.43 ^b	3.42	0.51	3.83	0.56	3.83 ^b	0.53	3.25	0.53	2.75	0.42	3.67	0.54
Confidence Interval A ^a	(2.27-5.06)		(2.35-4.15)		(2.22-4.45)		(2.11-4.06)		(2.12-4.21)		(2.25-3.59)		(2.05-5.11)	
Confidence Interval He ^a	(0.42-0.70)		(0.44-0.63)		(0.31-0.67)		(0.43-0.64)		(0.36-0.66)		(0.39-0.65)		(0.44-0.69)	

^a Estimated on the basis of 12 SSR loci amplified for these accessions without missing data ($\alpha = 0.01$)

^b Significant differences between original and regenerated population ($\alpha = 0.05$)

2.4.5. Identity between original and regenerated accessions

This research also compared seven original accessions with their corresponding regenerations carried out in Mexico and Uruguay. The diversity indexes A and H_e , estimated on the basis of 12 SSR (79 alleles) with no missing data for these 21 populations, did not differ between original and regenerated populations ($\alpha = 0.01$), nor with $\alpha = 0.05$ except in three cases (Table 3). However, these diversity indices as such are unable to detect specific allelic differences.

In addition, the original accessions and the regenerations were compared in a UPGMA phenetic tree based on Euclidian distances (Fig 6). Three original accessions were represented by the corresponding regenerations in Mexico and Uruguay (e.g. URZM 13007, 13004, 12006), with no significant difference in most of the loci (Supplementary material S6). In contrast, the accessions URZM 11004, 11006, 13005 regenerated in Uruguay, and the accessions 12001 and 13005 regenerated in Mexico showed maximum genetic distances with the corresponding original populations (Fig 6), and significant differences in allelic frequencies for most loci (Supplementary material S6).

The main causes of genetic differences were the presence of an allele in the original accession which was not represented in the regenerated population or, the other way around, when an allele was absent in the original accession and present in a regeneration (Fig 7). Most alleles in each original population were present in the corresponding regenerations, except in accession 13005, where the majority of alleles (23) were 'unique alleles' either for the original population, or the regeneration in Mexico or Uruguay, and only 18 alleles were common to the three populations (Fig 7). Correspondently, accession 13005 showed the maximum genetic distance between original and regenerated populations (Fig 6).

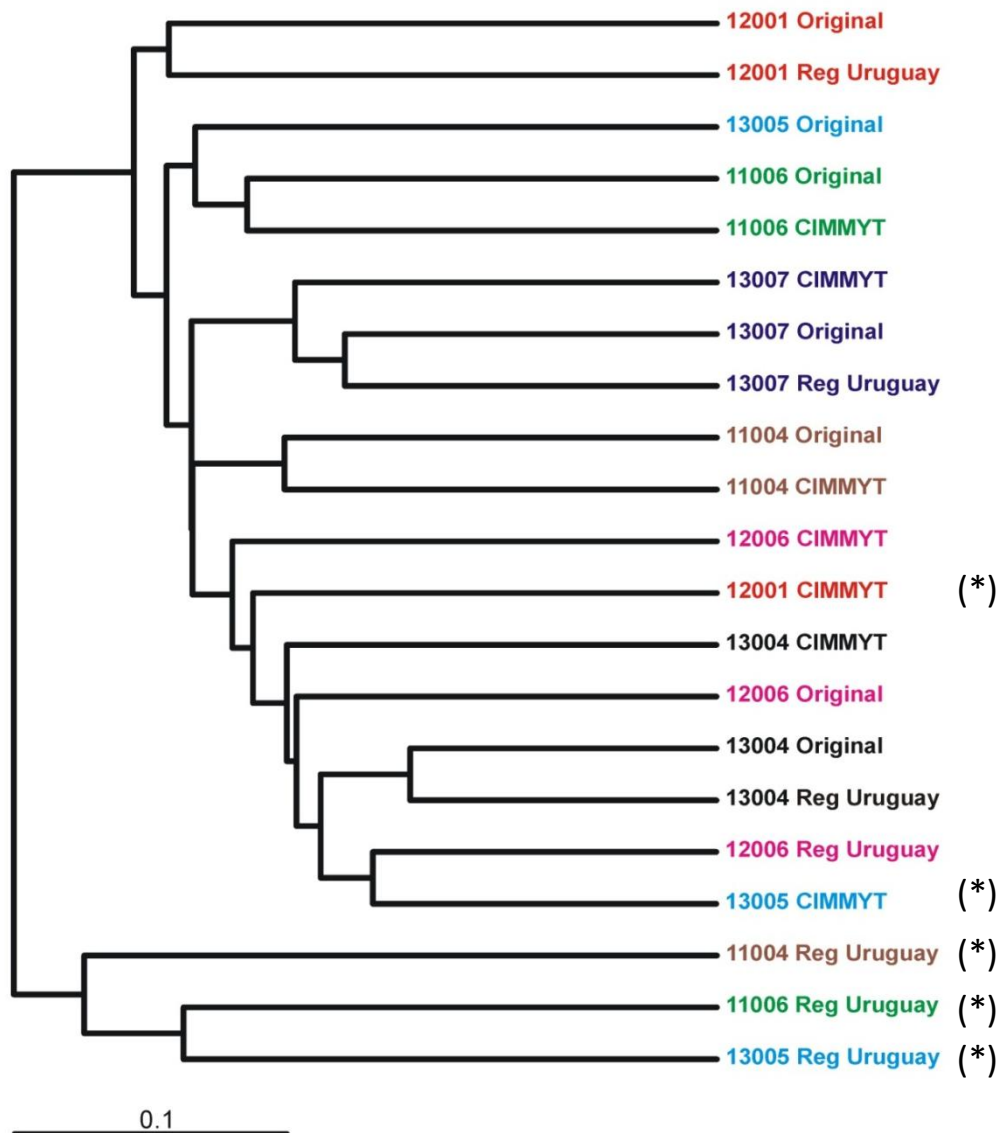


Fig 6 UPGMA phenetic tree based on Euclidean distances between accessions including seven original accessions and the corresponding regenerations in Mexico and Uruguay, according to the frequencies of 155 SSR alleles. (*) denotes the five regenerated population more distant from its originals

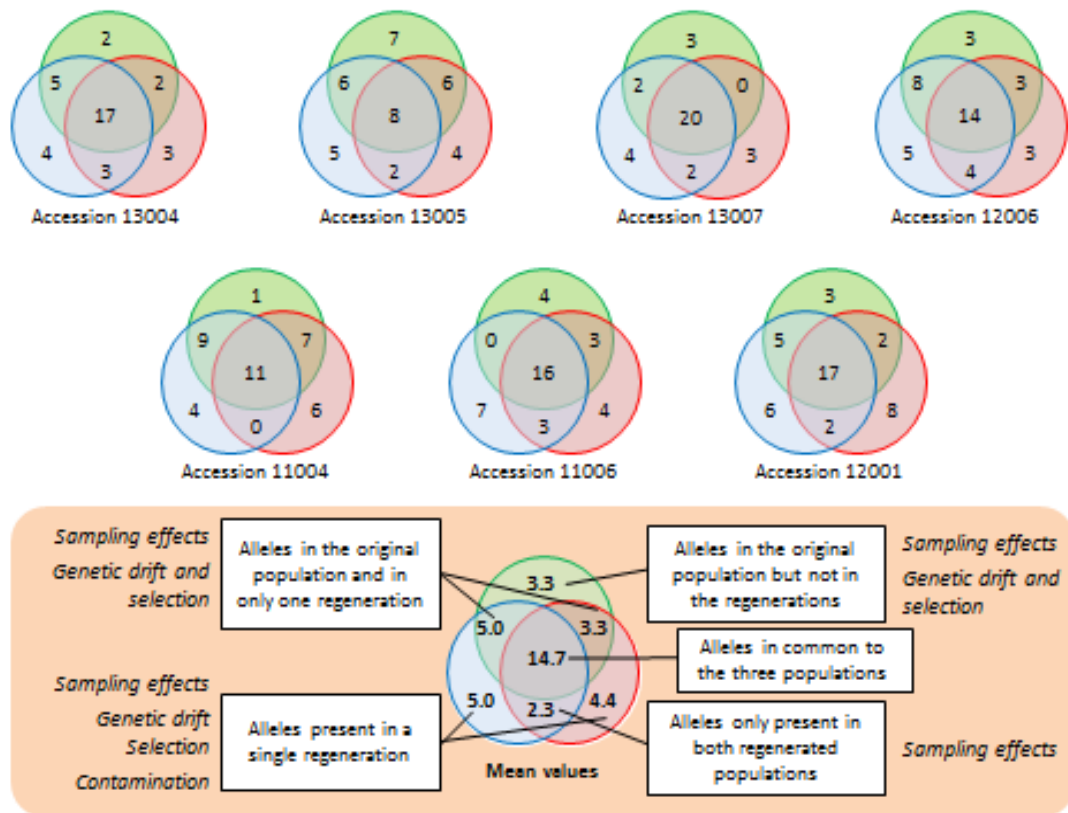


Fig 7 Number of alleles from 12 SSR markers shared by the original accessions (green circle on top) and the corresponding regenerations in Mexico (red, bottom right) and Uruguay (blue, bottom left), shared by two of the three populations, and unique alleles for the original population, Mexico or Uruguay, with indications for the putative causes under each situation

2.5 DISCUSSION

Landraces are defined as distinct populations that evolved under the influence of geographical or ecological conditions, such as climate, soil and crop management (Cömertpay et al. 2011). Landraces are diverse in their genetic composition between populations as well as within populations (Brown 1978; Angioi et al. 2011). In allogamous species the majority of the diversity is found within accessions or populations, and to a less extent between them (Hamrik and Godt 1996; Monteverde

et al. 2015). The approach followed in this study by DNA bulk sampling with SSR markers was appropriated to detect a considerable genetic diversity in the White Dent maize race of Uruguay. This diversity is remarkable regarding it is grown only in the lowlands (0-450 m) between 30-35° South Latitude.

2.5.1. Genetic diversity in the White Dent collection

The selected SSR were informative, since all of them were polymorphic for the collection with a mean PIC 0.532. The marker nc133, mapped to a near-centromere position on Chromosome 2, was the less suitable to discriminate between accessions, with a PIC value of 0.024 and only two alleles in the whole collection. On the other extreme, phi 227562 mapped on Chromosome 1 showed the maximum PIC value (0.882) and a total of 12 alleles in the collection. Similarly, Hidalgo et al. (2013) reported a mean PIC of 0.680 (range 0.23 – 0.82) in a study with 20 SSR, and a range from 2 to 8 alleles per marker.

The genetic diversity parameters estimated for our collection using SSR ($A = 7.43$, $A_e = 3.04$, $H_e = 0.58$, and 18 unique alleles) was comparable with values obtained in diversity studies with a single race of maize. Rice et al. (2006) reported $A = 7.3$ and $H_e = 0.62$ for the Jala race from Jala Valley (Mexico). Liu et al. (2009), using 52 SSR, also reported inferior values of A (6.44), but higher H_e (0.64) and 97 unique alleles analysing 34 White Dent landraces from different provinces of China.

The diversity indexes in our study were also comparable to those values found by Rice et al. (2006) for eight races from Mexico conserved *ex situ* ($A=6.7$, $H_e=0.55$ and 3 unique alleles), and average values found by Sanches et al. (2011) for all races from Mexico ($A = 4.57$ which is smaller than 7.3 found in our study; $H_e = 0.735$; range 0.31 - 0.86). Higher H_e values for Mexico are expected because is the centre of origin of maize, and there is a wide range of environment which includes different heights and latitudes. Arteaga et al. (2016) found that the distribution of genetic variation was better explained by environmental variables given by the interaction of altitude and latitude. Sharma et al. (2010) studied 48 maize landrace accessions representing diverse agro-ecological environments of India, and also reported a superior value of H_e (0.63) than the present study.

2.5.1.1. Diversity within accessions

The mean number of alleles per locus within accessions in the Uruguayan White Dent collection ($A=2.92$) was larger to other maize landraces collected out of the maize centre of diversity and lower to those found in the Mexican region. For example, A was 2.82 in a collection of Saharan maize analysed with SSR (Aci et al. 2013), 2.80 for maize landraces from Switzerland (Eschholz et al. 2010), and $A=2.55$ was found for the average number of alleles within accessions in landraces from the former Yugoslavia (Ignjatović-Micić et al. 2008). In contrast, Hidalgo et al. (2013) analysed the genetic diversity within populations for 28 landraces from Sinaloa in Mexico, using 20 SSR. The average number of alleles per locus was 4.06 within the accessions, with a range from 3.15 to 5.05, which mean higher values than the present study for landraces diversity in the centre of origin of maize.

The mean expected heterozygosity (H_e) within accessions in our study (0.442) was higher than that found in the Saharan landraces studied by Aci et al. 2013 (0.396) and similar to that found in Paraguayan maize ($H_e = 0.44$) by Noldin Almiron (2008). On the other hand, our H_e within accessions was lower than values found in studies involving more than one race, like Reif et al. (2006) for Mexican populations ($H_e = 0.61$), Lia et al. (2009) in North Argentina (0.57), and Hidalgo et al. (2013) who reported that gene diversity within accessions (H_s) varied from 0.49 to 0.67, with a mean of 0.60.

The number of unique alleles (18), the modal allelic frequency and the distribution of allelic frequencies within accessions show that the White Dent collection has a great diversity, since there are a few alleles with frequencies nearly fixed and the majority of the alleles have balanced frequencies below 0.50. Nevertheless, the distribution of the allele frequencies within the accessions for the whole collection (Fig. 1a) is typical of recent bottleneck events (Luikart et al. 1998). For large populations in equilibrium predominate alleles at lower frequencies (< 0.10), whereas in populations subjected to recent bottleneck events increase alleles with intermediate frequencies (0.10 - 0.30) (Luikart et al. 1998).

The relative low difference between the within accessions indices A (2.88) and A_e (1.79) reflects a considerable diversity within accessions, in line with the

high within accessions diversity (74.9%) of the total White Dent maize diversity. Only seven of the ninety accessions showed inbreeding signals, with 25 to 38% of fixed loci (accessions 3114, 3663, 8102, 8115, 8123, 8125, 8133). These accessions may have suffered inbreeding due to assortative mating, small population size, or the collection sample was not representative of the original diversity (Crossa et al. 1993, 1994).

2.5.1.2. Diversity among accessions

The main share of diversity in the White Dent maize collection resided within accessions (74.9%), whereas the minor share was the diversity between accessions (25.1%; $G_{ST} = 0.251$). Other studies reported similar partition of the genetic diversity in within and between accessions. Aci et al. (2013) reported 69 and 31% respectively, and Yao et al. (2008), for 124 Chinese landraces, found 87 and 13%. Both studies included landraces from various races. Even lower values for between accessions diversity were found by Sanchez et al. (2011), where the mean G_{ST} was 0.102 throughout all races of Mexico (minimum 0, maximum 0.631).

As the diversity between accessions (G_{ST}) in the present study was similar to other studies including several races, the White Dent collection from Uruguay shows conspicuous variation between accessions, even when all accessions were collected from lowlands and in a narrow scope of latitudes. This diversity between accessions could be explained by different origins of the germplasm, recent bottleneck effects or the hybridization of some accessions with commercial cultivars, since selection has usually no impact on the neutral SSR markers.

2.5.2. Genetic structure of the collection

The three approaches to analyse the genetic structure distinguished four main groups in the Uruguayan White Dent maize collection with a high concordance between them. Concordance is observed by the accessions within groups, even when different clustering algorithms could result somewhat in different grouping (Reif et al. 2005b), as well as the genetic distances between groups. A concordance was

observed also with the Bayesian analysis, where clusters 1 and 2, the more distant groups, are each built mainly by a defined genetic background, whereas groups 3 and 4 showed populations with gametes constituted by different genetic backgrounds or admixed individuals (Pritchard et al. 2000). These admixture individuals visualized through the Bayesian approach (Figure 2b) could justify the shorter genetic distance between accessions in the groups 3 and 4 determined by Ward and Canonical algorithms.

The four genetic backgrounds represented in the Bayesian approach could be associated with the origin of the germplasm (Pritchard et al. 2000). Whereas groups 1 and 2 has defined genetic backgrounds, the others could result from a mixture of origins due to seed exchange between farmers in order to improve crop performance, and pollen flow between neighboring maize populations (Louette et al. 1997).

The coincidence between Ward and Bayesian approaches was not necessarily expected. Whilst Ward is a distance based method aiming at the minimum distance between accessions in a group (Ward 1963), the Bayesian approach is a model based method which assumes linkage equilibrium within populations and Hardy-Weinberg equilibrium within populations (Pritchard et al. 2000). According to Luikart et al. (1998), our accessions could have suffered from bottleneck effects, so the lack of H-W equilibrium within accessions is highly probable. The presence of admixture individuals in groups 3 and 4 reveals genetic flow between populations and is another reason supporting the lack of H-W equilibrium. Ward and Bayesian clustering give complementary information: Ward provides genetic distances between accessions, and Structure provides insights about the underneath history and dynamic of populations.

Even when Uruguay is situated far distant from the centre of origin of maize in Mexico (Matsuoka et al. 2002) or Mesoamerica 8000 years BP (Kato TA 2005), indirect registry of maize have been found in Southeast Uruguay dated on 4100 years BP (Iriarte et al. 2004). The White Dent race of maize in Uruguay may have come from diverse origins and events of hybridizations (Paterniani and Goodman 1977). The presence of white maize types with floury endosperm was early described in

times of the Spanish colony (Perez Castellano 1814). Such a maize type would correspond with the indigenous white race 'Morotí' (Paterniani and Goodman 1977). Besides, the indigenous 'Caingang' race, characterized by its white dent grains, was spread in South Brazil and Uruguay. The 'Morotí' and 'Caingang' indigenous races could be relatives (Paterniani and Goodman 1977). Apart from this indigenous races, another documented origin is the introduction of White Dent maize from United States of America. One wave of introduction in South Brazil took place in the second half of 19th Century, and evolved as the race known as 'Dente Branco' (Paterniani and Goodman 1977), whereas another introduction of White Dent maize for silage and forage in 1914 in Uruguay was described by Boerger (1928). All these historical origins may have contributed to the actual diversity and structure of the White Dent maize collection evaluated in this research.

Genetic distances were not related with geographical distances among accessions. Other studies found that maize landraces from a given geographical origin belonged to different groups, indicating that genetic groups in maize based on SSR markers did not reveal the geographical origin, and did not necessarily follow a spatial pattern (Ristić et al. 2013, Cömertpay et al. 2011, Wen et al. 2012). The lack of relationship between genetic and geographical distances could be explained by farmers' selection for diverse preferences and adaptation to local agro-climatic conditions dragging SSR alleles, as well as exchange of seeds by farmers from distant regions. As a summary, movement of landraces among regions, mixing and introgression on local pre-existing germplasm could explain the lack of correlation between geographical and genetic distances (Cömertpay et al. 2011).

The spread and diversification of maize along the regions lead to new variants, a process favoured by the genotype × environment interaction and the geographical isolation (Sánchez et al. 2000, Goodman and Brown 1988, Ortega-Paczka 2003, and Pressoir and Berthaud 2004). However, this process takes time, requires high diversification in ecosystems, and genetic isolation. These conditions could not be the case for the White Dent race in Uruguay, as there are no relevant differences in cultivation environments and there is exchange of materials between

farmers. Subsequently, the single driving force for the structure of the White Dent collection could be the diverse historical origins of the germplasm.

The phenotypic evaluations we performed in 2014 were positively correlated with the evaluations made in 1979 (De María et al. 1979, Fernández et al. 1983), in spite of the difference in sowing dates and environmental and agronomic conditions. The lack of positive correlation between the genetic structure of the Uruguayan White Dent maize collection and the phenotypic traits could be an expected output, since SSR markers are neutral, and would not be associated to specific traits (Collard et al. 2005, Perales and Golicher 2014). The absence of positive association was observed in other studies relating phenotypical and molecular data with maize accessions (Ristić et al. 2013) and other allogamous crop species (Monteverde et al. 2015, Roldan-Ruiz et al. 2001). The number of SSR markers in these studies is enough for an analysis of genetic diversity and structure, but not for a statistical association with a specific quantitative trait (Perales and Golicher 2014). Nevertheless, in our study, loci determining the weight of cobs or the number of tillers per plant could be linked with specific SSR markers, and such a linkage would explain the statistical association between these phenotypical traits and the genetic structure of the collection.

Various studies showed differences between maize accessions in phenotypical traits like time to flowering and ear characteristics (Pressoir and Berthaud, 2004a, b; van Heerwaarden et al. 2009), whilst their differentiation by genetic distance was relatively low. These findings suggests that both phenotypic and genetic characterizations are necessary to get accurate assessment of genetic structure and diversity and its usability in breeding programmes.

2.5.3. Representativeness of the core collection

Even when there was no positive correlations between genetic and phenotypic distances the core collection previously defined on the basis of phenotypic traits by Malosetti and Abadie (2001) was confirmed by SSR molecular markers, as there was no significant difference between the diversity indexes in the core and base

collection, and also the core collection represents properly the genetic structure of the White Dent base collection.

According to the classification of core collections made by Odong et al. (2013), the core collection of Uruguayan White Dent maize designed by Malosetti & Abadie (2001) and then confirmed by Ozer Ami et al. (2004) could be classified as type I, since each cluster is represented by one accession. The only difference to adjust exactly to type I is that the entry from each cluster were randomly taken (Ozer Ami et al. 2004), but not choosing the accession with minimum average distances with the other ones. Despite accessions were chosen at random within each cluster, mean diversity indexes per accession A , $\%P$ and H_s were similar in the core collection and the base collection, as expected for a subset saving high diversity. These means that the core collection holds a large number of alleles in intermediate balanced frequencies. Yao et al. (2008) also found larger values in the indexes A and $\%P$ for the core collection than those indexes for the whole collection.

The resulting core collection caught 18.8% of the total number of White Dent accessions, whereas several authors suggest sampling intensities that range from 5 to 20% in core collections design (Brown 1989; Brown and Spillane 1999; van Hintum, 1999; van Hintum et al. 2000). The high sampling intensity applied by Malosetti and Abadie (2001) is due to the high phenotypic variability present in the whole White Dent maize collection from Uruguay (Ozer Ami et al. 2004). In this sense, Balfourier et al. (1999) affirm that 10% of the accessions is a good criterion to represent the diversity of neutral genes, but Diwan et al. (1995) and Balfourier et al. (1999) reported in their experiments that 10% is not enough to represent the variability for agronomic traits.

In our study, the high percentage of retained alleles in the core collection with respect to the whole collection (81.9%) and the coverage value achieved (82.14%) could be a consequence of the high sampling intensity applied (18.8% of the total accessions). According to Brown (1989a) in an infinite number of multi-allelic neutral loci, a selection intensity of 10% of the accessions retained at least 70% of the alleles present in the whole collection with 95% of confidence. Our results for allelic retention in the core collection are in concordance with Brown (1989a) who

reports significant increases (over 70%) in the proportion of retained alleles when selection intensities surpass 10%.

According to our results, the retention of alleles by the entries is not total, as expected for a core collection type I (Marita et al. 2000; Odong et al. 2013). The procedure applied in the creation of the Uruguayan white dent core collection could be considered as stratified random sampling (Malosetti and Abadie 2001; Ozer Ami et al. 2004). This procedure ensures the conservation of common-localized alleles (Brown 1989a; Crossa et al. 1994). Common localized alleles are those favoured by selective pressures conferring adaptation to specific environmental conditions (Brown 1989a, Allard 1992). These alleles control traits of agronomic importance, such as resistance and tolerance to biotic and abiotic stresses turning them valuable for plant breeders (Marita et al. 2000, Malosetti and Abadie 2001).

Alleles not present in the core collection could be those carried by extreme accessions, which would be the goal in core collections type II aiming to catch the extremes of the base collection (Odong et al. 2013). Core collections representing the total diversity would require higher sampling intensities. In this sense, Corrado et al. (2014) compared methodologies to elaborate a core collection type 2 of tomato landraces, and indicated that a sampling intensity between 15% and 25% is optimal to guarantee an extensive allelic coverage with a reduced redundancy.

2.5.4. Genetic integrity of regenerated accessions

In the present study most of the regenerations preserved the genetic integrity of original accessions, but differences between original and regenerated populations were found in 5 of 14 cases. Changes in allele composition and allele frequencies could be associated to sampling effects, and therefore conclusions over these findings should be cautionary. Warburton et al. (2010) reported significant sampling effect for paired bulks with 15 individuals in 17% of the checked populations. Thus, in terms of analysing the integrity of regenerated accessions, sampling for the bulks would cause a residuary but significant source of variation. When sampling effects are overcome by a deeper sampling intensity, true differences between original and regenerated accessions are revealed. Wen et al. (2011) worked with eight bulks of 15

plants per accession. They found a proportion of lost alleles from 0 to 22.6% in the regenerations, and also a proportion of 0 to 19.9% of alleles which appears in the regenerations but no in the original populations, showing that preservation of genetic integrity in regenerated accessions is imperfect.

Beyond sampling effects, we found that most alleles were preserved in most regenerated populations, whilst some others may be lost or may be new (Fig. 7). Lost alleles may be the consequence of genetic drift or genetic selection imposed by the regeneration environment (Reedy et al. 1995). Rare alleles (present in low frequencies) will be those with higher chance of being lost during the regeneration process due to genetic drift and sampling effects. Indeed, in our study, alleles unique to the original or regenerated populations had frequencies below 0.10 (data not shown). New allelic variants are not expected in the regenerated populations, except for mutations or sampling effects, and could be the consequence of genetic flow by contamination with alien pollen. In contrast, alleles absent in the original population but present in both regenerations would be certainly the cause of sampling effects, as the chance for identical contamination in two locations is highly unexpected (Fig.7).

Besides changes in allele composition, changes in the genetic frequencies of the alleles also occurred. In the present study, on average, 58% of the SSR showed significant differences in the allelic frequencies between original and regenerated populations. Soengas et al. (2009) found that up to 34% of the SSR alleles in *Brassica oleracea* showed significant differences in allelic frequencies, when original versus regenerated accessions were compared. Wen et al. (2011) detected significant changes in allelic frequencies for 37 SNP maize markers and, in some cases, the H_e diversity index decrease in comparison with the original as a consequence of lost alleles and extreme allelic frequencies.

The lack of genetic integrity in accession 13005, which shows the higher genetic distance between original and regenerated populations, is also reflected in significant differences in allelic frequencies (92% of SSR for the regenerated in Uruguay) and the higher proportion of unique alleles in regenerations (36%). This accession is a clear example of quality risks during regenerations. Small population size may cause inbreeding and genetic drift, reducing genetic diversity. More than

100 plants are needed in paired or chained crosses, where a given plant acts as a pollen receptor from a second plant, and pollen donor to a third plant in order to increase the effective population size (Crossa 1989; Crossa et al.1994). Assortative mating hinder the panmixia and my favour the process of genetic drift. This phenomenon is highly probable because we observed long flowering periods in the White Dent accessions, with 15 to 22 days difference in pollen shed between the first and last flowering plant within a plot.

Since the regeneration process may induce changes in the genetic integrity of the accessions, the design of representative core collections arise as a warranty of conservation. As smaller key sets, core collections may have more exhaustive procedures to maximize the genetic identity during regeneration. In addition, *on farm – in situ* conservation arise as a complementary strategy in the conservation of landraces genetic diversity (Rivas and Condón 2016), as a dynamic process in which the natural and farmers selection act.

2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The first author acknowledges a project fellowship from Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Universidad de la República, Uruguay.

2.7 REFERENCES

- Abadie T, Vivo G, Olveyra M (1997) Uruguay LAMP final report. In: Salhuana W. et al. (eds), LAMP final report. Pioneer Hi-Bred Intl. Spec. Publ. G12083, Johnston, IA 94–110
- Aci MM, Revilla P, Morsli A, Djemel A, Belalia N, Kadri Y, Khelifi-Saloui M, Ordás B, Khelifi L (2013) Genetic diversity in Algerian maize (*Zea mays* L) landraces using SSR markers. *Maydica* 58: 304-310
- Allard RW (1992) Predictive methods for germplasm identification. In: Stalker HT, Murphy JP (eds), *Plant Breeding in the 1990's*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 119–146.

- Angioi SA, Rau D, Nanni L, Bellucci E, Papa R, Attene G (2011) The genetic make of the European landraces of the common bean. *Plant Gen Res Charact Utiliz* 1–5. doi:10.1017/S1479262111000190
- Arteaga MC, Moreno-Letelier A, Mastretta-Yanes A, Vázquez-Lobo A, Breña-Ochoa A, Moreno-Estrada A, Eguiarte LE, Piñero D (2016) Genomic variation in recently collected maize landraces from Mexico. *Genomics Data* 7: 38–45
- Balfourier F, Prosperi JM, Charmet G, Goulard M, Monestiez P (1999) Using spatial patterns of diversity to develop core collections. In: Johnson RC, Hodgkin T (eds), *Core collections for today and tomorrow*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, pp. 37–48.
- Bedoya CA, Dreisigacker S, Hearne S, Franco J, Mir C, Prasanna BM, Taba S, Charcosset A, Warburton ML (2017) Genetic diversity and population structure of native maize populations in Latin America and the Caribbean. *PLoS ONE* 12(4): e0173488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173488>
- Bedoya CA (2012) Estudios de diversidad genética en poblaciones de maíz (*Zea mays* L.) evaluadas con microsatélites. Ph.D. thesis. Palma de Mallorca. Universitat de les Illes Balears. 209p
- Berretta A, Condon F, Rivas M (2007) Segundo informe país sobre el estado de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Montevideo. 120p.
- Berg EE, Hamrick JL (1997) Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Can J Forest Res* 27:415–424.
- Blacket MJ, Robin C, Good RT, Lee SF, Miller AD (2012) Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Molecular Ecology Resources* 12, 456–463. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03104.x
- Boerger A. (1928) Observaciones sobre agricultura: quince años de trabajos fitotécnicos en Uruguay. [Agricultural notes: Fifteen years of crop breeding in Uruguay] Montevideo. 436p
- Börner A, Chebotar S, Korzun V (2000) Molecular characterization of the genetic integrity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm after long-term maintenance. *Theor Appl Genet* 100: 494–497

- Brown AHD (1989) Core collections: a practical approach to genetic resources management. *Genome* 31:818-824
- Brown AHD (1978) Isozymes, plant population genetics structure and genetic conservation. *Theor Appl Genet* 52:145–157
- Brown AHD, Spillane C (1999) Implementing core collections principles procedures, progress, problems and promise. In Johnson RC, Hodgkin T (ed.). *Core collections for today and tomorrow*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome. p. 1–9
- Ceretta S et al. (1997) Informe presentado a la comisión certificadora de semillas: Sector Cultivos de Verano. Maíz. INIA 47p
- Charcosset A, Moreau L (2004) Use of molecular markers for the development of new cultivars and the evaluation of genetic diversity. *Euphytica* 137: 81-94
- CIMMYT (2005) Laboratory protocols. Applied molecular genetics laboratory (3rd ed). Mexico DF. CIMMYT
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB and Pang ECK (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169–196 doi: 10.1007/s10681-005-1681-5
- Cömertpay G, Baloch FS, Kilian B, Ülger AC, Özkan H (2012) Diversity assessment of Turkish maize landraces based on fluorescent labelled SSR markers. *Plant Mol Biol Rep* 30: 261-274. doi: 10.1007/s11105-011-0332-3
- Corrado G, Caramante M, Piffanelli P, Rao R (2014) Genetic diversity in Italian tomato landraces: Implications for the development of a core collection. *Scientia Horticulturae* 168 138–144
- Crossa J (1989) Methodologies for estimating the sample size required for genetic conservation of outbreeding crops. *Theor. Appl. Genet.* 77:153–161.
- Crossa J, Taba S, Eberhart SA, Bretting P and Vencovsky R (1994) Practical considerations for maintaining germplasm in maize. *Theor Appl Genet* 89: 89–95

- Crossa J, Hernandez CM, Bretting P, Eberhart SA, and Taba S (1993) Statistical considerations for maintaining germplasm collections. *Theor Appl Genet* 86: 673–678.
- De María F, Fernández GM, Zoppolo JC (1979) Caracterización agronómica y clasificación racial de las muestras de maíz coleccionadas en Uruguay bajo el proyecto I.B.P.G.R (International Board for Plant Genetic Resources). B.Sc. Thesis. Montevideo. Facultad de Agronomía, Universidad de la República
- Di Rienzo JA, Cassanoves F, Balzrini MG, González L, Cuadroda M, Robledo CW (2012) InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.
- Diwan N, McIntosh MS, Bauchan GR (1995) Methods of developing a core collection of annual *Medicago* species. *Theor Appl Gen* 90: 755–761
- Dubreuil P, Rebourg C, Merlino M, Charcosset A (1999) The DNA pooled sampling strategy for estimating RFLP diversity of maize population. *Plant Mol Biol Rep* 17:123–138
- Dubreuil P, Warburton ML, Chastanet M, Hoisington D, Charcosset A (2006) More on the introduction of temperate maize into Europe: large-scale bulk SSR genotyping and new historical elements. *Maydica* 51: 281-291
- Eschholz TW, Stamp P, Peter R, Leipner J, Hund A (2010) Genetic structure and history of Swiss maize (*Zea mays* L. ssp. *mays*) landraces. *Genet Res Crop Evol* 57: 71-84
- Eschholz TW, Peter R, Stamp P, Hund A (2008) Genetic diversity of Swiss maize (*Zea mays* L) assessed with individual and bulks on agarose gel. *Genet Res Crop Evol* 55: 971-983
- Evano G, Regnaut S, Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611-2620
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587

- Fernández G, Frutos E, Maiola C (1983) Catálogo de recursos genéticos de maíz de Sudamérica. Uruguay. EERA-Pergamino. Pergamino, Argentina
- Franco J, Warburton M, Dubreuil P, Dreisigacker S (2005) User's manual for the FREQS-R program for estimating allele frequencies for fingerprinting and genetic diversity studies using bulked heterogeneous populations. CIMMYT, Mexico
- Franco J, Crossa J, Ribaut JM, Bertran J, Warburton ML, Khairallah M (2001) A method for combining molecular markers and phenotypic attributes for classifying plant genotypes. *Theor Appl Gen* 103: 944-952
- Goodman MM, Stuber CW (1983) Races of maize. VI. Isozyme variation among races of maize in Bolivia. *Maydica* 28: 169-187
- Gutiérrez L, Franco J, Crossa J, Abadie T (2003) Comparing a preliminary racial classification with a numerical classification of the maize landraces of Uruguay. *Crop Science* 43: 718-727.
- Gower JC (1971) A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics* 27: 857-874.
- Goodman MM, Brown WL (1988) Races of corn. In: Sprague GF, Dudley JW, editors. *Corn and corn improvement*. Third edition. ASA, CSSA, SSSA publishers, Madison, Wisconsin, USA.
- Hambling MT, Warburton ML, Buckler ES (2007) Empirical comparison of simple sequence repeats and single nucleotide polymorphisms in assessment of maize diversity and relatedness. *PloS One* 12:e1367
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4(1):9p.
- Hamrick JL, Godt MJW (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Phil Trans R Soc Lond B351*: 1291-1298. doi: 10.1098/rstb.1996.0112.
- Hidalgo KVP, Méndez-Marroquín KP, Alvarez EV, Chávez-Ontiveros J, Sánchez-Peña P, Garzón-Tiznado JA, Vega-García MO, López-Valenzuela JA (2013) Microsatellite-based genetic diversity among accessions of maize landraces from Sinaloa in México. *Hereditas* 150: 53-59

- Hijmans RJ, Guarino L, Cruz M, and Rojas E. (2001) Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. DIVA-GIS. *Plant Gen Res Newsletter* 127: 15-19
- Ignjatovic-Micic D, Drinic S.M, NikolicA, JancicV.L (2008): SSR-analysis for genetic structure and diversitydetermination of maize local populations from former Yugoslavia territories. *Russian Journal of Genetics*.Vol. 44, No. 11, pp. 1317–1324, ISSN 1022-7954.
- Iriarte J, Holst I, Marozzi O, Listopad C, Alonso E, Rinderknecht A, Montaña J (2004). Evidence for cultivar adoption and emerging complexity during the mid-Holocene in the La Plata basin. *Nature* 432(7017), 614-617.
- Kato TA (2005). Cómo y dónde se originó el maíz. *Investigación y Ciencia*, 347: 68-72.
- Lia V, Poggio L , Confalonieri V (2009) Microsatellite variation in maize landraces from Northwestern Argentina: genetic diversity, population structure and racial affiliations. *Theor Appl Genet* 119:1053-1067
- Liu Z, Guo R, Zhao J, Cai Y, Wang F, Cao M, Wang R, Shi Y, Song Y, Wang T and Li Y (2009) Genetic Diversity of Two Important Groups of Maize Landraces with Same Name in China Revealed by M13 Tailed-Primer SSRs. *Agricultural Sciences in China* 8: 15-23
- Louette D, Charrier A, Berthaud J (1997) In situ conservation of maize in Mexico: genetic diversity and maize seed management-in a traditional community. *Econ Bot* 51: 20–38.
- Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM, Sherwin WB (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J Hered* 89:238–247. doi:10.1093/jhered/89.3.238
- Malosetti M and Abadie T (2001) Sampling strategy to develop a core collection of Uruguayan maize landraces based on morphological traits. *Genetic Resources and Crop Evolution* 48:381-390
- Marita JM, Rodriguez JM, Nienhuis J (2000) Development of an algorithm identifying maximally diverse core collections. *Genet Resour Crop Evol* 47(5):515–526

- Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, Sánchez J, Buckler E, Doebley J (2002) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9): 6080-6084.
- Mehta CR, Patel NR, Tsiatis AA (1984) Exact significance testing to establish treatment equivalence with ordered categorical data. *Biometrics* 40: 819–825
- Monteverde E, Galván GA, Speranza P (2015) Genetic diversification of local onion populations under different production systems in Uruguay. *Plant Gen Res Charact Utiliz* 13: 238-246
- Nagy S, Poczai P, Cernák I, Gorji AM, Hegedűs G and Taller J (2012) PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Bioch Gen* 50: 670-672. Available at: <http://w3.georgikon.hu/pic/kezi.aspx>
- Nei M (1982) Evolution of human races at the gene level. In: Bonné-Tamir B, P. Cohen P, Goodman R. (eds). *Human Genetics, Part A, the unfolding genome*. New York. Liss AR p.167-181
- Noldin Almiron OJ (2008) Análisis multivariante de la colección nuclear de la raza Avati Morotí de Paraguay. DEA en agronomía. Universidad de Vigo, España
- Odong TL, Jansen J, van Eeuwijk FA, van Hintum TJL (2013) Quality of core collections for effective utilization of genetic resources: review, discussion and interpretation. *Theor Appl Genet* 126: 289-305. doi:10.1007/s00122-012-1971-y
- Ortega-Paczka R (2003). La diversidad del maíz en México. In: Esteva G, Marielle C (eds), *Sin maíz no hay país*. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, Dirección General de Culturas Populares: Mexico, pp 123–154.
- Ozer Ami H, Suarez R, Abadie T (2004) Elaboración de una colección núcleo para la colección de germoplasma de maíz de la raza Blanco Dentado. *Agrociencia Uruguay* 1: 1-10
- Paterniani E, Goodman MM (1977) *Races of maize in Brazil and adjacent areas*. CIMMYT, México, D.F.
- Perales H, Golicher D (2014) Mapping the diversity of maize races in Mexico. *PLoS one* 9: e114657

- Pérez Castellanos JM (1814) Observaciones sobre agricultura, 1814. In: Selección de escritos. Biblioteca Artigas, 1968 (Clásicos Uruguayos, Vol. 131). Ministerio de Cultura. http://www.rapaluruaguay.org/publicaciones/Observaciones_sobre_Agricultura.html
- Porta B, Antúnez MJ, Olaizola J, Vidal R (2013) Identificación y análisis de diversidad de variedades criollas de maíz conservadas in situ – on farm em Tacuarembó, Uruguay. IX Simposio Internacional de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe, Ajacutla. p. 35
- Prasanna BM (2010) Phenotypic and molecular diversity of maize landraces: characterization and utilization. *Indian J. Genet.* 70: 315–327
- Pressoir G, Berthaud J (2004a) Patterns of population structure in maize landraces from the Central Valleys of Oaxaca in Mexico. *Heredity* 92: 88–94
- Pressoir G, Berthaud J (2004b) Population structure and strong divergent selection shape phenotypic diversification in maize landraces. *Heredity* 92: 95–101
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- R Development Core Team (2013) R: a language and environment for statistical computing. Vienna. R Foundation for Statistical Computing (<http://www.R-project.org>)
- Reedy ME, Knapp AD, Lamkey KR (1995) Isozyme allelic frequency changes following maize (*Zea mays* L.) germplasm regeneration. *Maydica* 40:269-273
- Reif JC, Warburton ML, Xia XC, Hoisington DA, Crossa J, Taba S, Muminović J, Bohn M, Frisch M, Melchinger AE (2006) Grouping of accessions of Mexican races of maize revisited with SSR markers. *Theor Appl Gen* 113: 177–185
- Reif JC, Hamrit S, Heckenberger M, Schipprack W, Peter Maurer H, Bohn M, Melchinger AE (2005a) Genetic structure and diversity of European flint maize populations determined with SSR analysis of individual and bulks. *Theor Appl Genet* 111: 906-913
- Reif JC, Melchinger AE, Frisch M. (2005b) Genetical and mathematical properties of similarity and dissimilarity coefficients applied in plant breeding and seed bank management. *Crop Science* 45(1): 1-7

- Rice EB, Smith ME, Mitchell SE, and Kresovich S (2006) Conservation and change: a comparison of in situ and ex situ conservation of Jala maize germplasm. *Crop Science* 46: 428–436
- Ristić D, Babić V, Anđelković V, Vančetović J, Mladenović Drinićand S, Ignjatović Micić D (2013) Genetic diversity in maize dent landraces assessed by morphological and molecular markers. *Genetika*. 45: 811-824
- Rivas M, Condón F (2015) Plant domestication and utilization: the case of the Pampa Biome. In: Al-Khayri JM, Mohan Jain S, Johnson DV (eds) *Advances in plant breeding strategies: breeding, biotechnology and molecular tools* (v.1). Springer. p.3-24
- Roldán-Ruiz I, van Eeuwijk FA, Gilliland TJ, Dubreuil P, Dillmann C, Lallemand J, De Loose M, Baril CP (2001) A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. *Theor Appl Gen* 103: 1138-1150
- Salhuana W, Pollak LM, Ferrer M, Paratori O, Vivo G (1998) Breeding potential of maize accesions from Argentina, Chile, USA, and Uruguay. *Crop Science*, 38: 886-872
- Sánchez GJJ (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.
- Sánchez GJ, Goodman MM, and Stuber CW (2000) Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Econ Bot* 54: 43-59
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nat Biotech* 18: 233-234
- Sharma L, Prasanna BM, Ramesh B (2010) Analysis of phenotypic and microsatellite-based diversity of maize landraces in India, especially from the North East Himalayan region. *Genetica* 138: 619-631. doi:10.1007/s10709-010-9436-1

- Soengas P, Cartea E, Lema M, Velasco P (2009) Effect of regeneration procedures on the genetic integrity of *Brassica oleracea* accessions. *Mol Breeding* 23: 389–395
- van Hintum TJJ, Brown AHD, Spillane C, Hodkin T (2000) Core collections of plant genetic resources. IPGRI Technical Bulletin 3. Roma, Int Plant Gen Res Institute
- van Heerwaarden J, Hellin J, Visser RF, van Eeuwijk FA (2009) Estimating maize genetic erosion in modernized smallholder agriculture. *Theor Appl Genet* 119: 875–888.
- Vidal R, Bellenda F, Estramil E, Fernández G, Lafluf P, Olveira M, Ozer Ami H, Vivo G (2009) Obtención de una variedad de polinización abierta de maíz exitosa a partir de germoplasma local. VII Simposio de recursos genéticos para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile
- Vilaró M (2013) Estudio de la diversidad genética de colecciones de maíz (*Zea mays* L.) del cono sur de América. M.Sc. Thesis, Facultad de Ciencias, Montevideo
- Warburton M, Setimela P, Franco J, Cordova H, Pixley K, Banziger M, Dreisigacker S, Bedoya C, Mac Robert J (2010) Towards a cost-effective fingerprinting methodology to distinguish maize open-pollinated varieties. *Crop Science*,. 50: 467–477.
- Ward J (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J Amer Stat Assoc* 58: 236–244
- Wen W, Taba S, Shah T, Tovar VHC, Yan J (2011) Detection of genetic integrity of conserved maize (*Zea mays* L.) germplasm in genebanks using SNP markers. *Genet Res Crop Evol* 58: 189–207
- Wen W, Franco J, Chavez-Tovar VH, Yan J, Taba S (2012) Genetic characterization of a core set of a tropical maize race Tuxpeño for further use in maize improvement. *Plos One* 7(3): e32626. doi:10.1371/journal.pone.0032626
- Winter P, Kahl G (1995) Molecular marker technologies for plant improvement. *World J Microbiol Biotech* 11: 438–448

- Wright S (1978) Evolution and the genetics of populations. Vol.4: Variability within and among natural populations. Chicago, University of Chicago Press
- Yao Q, Fang P, Kang K, Pan G (2008). Genetic diversity based on SSR markers in maize (*Zea mays* L.) landraces from Wuling mountain region in China. J Genet 87: 287-291
- Yu JM, Zhang ZW, Zhu CS, Tabanao DA, Pressoir G, Tuinstra MR, Kresovich S, Todhunter RJ, Buckler ES (2009) Simulation appraisal of the adequacy of number of background markers for relationship estimation in association mapping. The Plant Genome 2: 63–77

3.

DISCUSIÓN GENERAL

La raza Blanco Dentado es de importancia a nivel mundial tanto para la producción de silo y forraje (<http://www.fao.org/docrep/003/x7650S/x7650s07.htm>), así como para diversos usos culinarios en la alimentación humana (Serna-Saldivar et al. 1994; Dowsell et al. 1996). También para el aporte de germoplasma en la creación de cultivares híbridos de maíz de alto rendimiento (Anderson and Brown 1952, Liu et al. 2009). También como material genético base en el desarrollo de variedades de polinización abierta de alto potencial de rendimiento y adaptación para sistemas productivos de bajos insumos (Vidal et al. 2009). La estrecha base genética de los programas de mejoramiento ha sido una limitante para lograr un mayor progreso genético (Goodman 2005). En este sentido, Salhuana et al. (1998) identifican variedades criollas de la Raza Blanco Dentado de la colección uruguaya que mostraron buena aptitud combinatoria con materiales de importancia histórica en el mejoramiento de maíz en Estados Unidos.

Esta investigación demostró la diversidad de la colección de maíz Blanco Dentado de Uruguay, mediante marcadores microsatélites. Esa diversidad se corresponde con la alta diversidad fenotípica entre las accesiones (De María et al. 1979, Fernández et al. 1983). A pesar de la alta diversidad en la colección, la diversidad alélica promedio evaluada por la distribución de las frecuencias alélicas en las accesiones, mostró ser típica de poblaciones que sufrieron recientemente un *bottleneck*, caracterizado por frecuencias alélicas intrapoblacionales mayores a 0.10 (Luikart et al. 1998). Este fenómeno podría ser resultado de un reducido tamaño de muestra durante la colecta, y que ese muestreo no haya captado la diversidad real de las poblaciones o variedades criollas (Crossa et al. 1993, 1994).

La introgresión de germoplasma exótico en el mejoramiento de maíces de elite se ha incrementado con el programa *Germplasm Enhancement of Maize* (GEM) (Goodman 2005). La presencia de accesiones de la raza Blanco Dentado uruguaya con destacada aptitud combinatoria general cuando fueron combinadas con materiales de importancia histórica en el mejoramiento de maíz en USA (Salhuana et

al. 1998), abre perspectivas para realizar introgresiones en programas de mejoramiento. La elevada aptitud combinatoria habría resultado por la acumulación de alelos favorables, producto de la selección realizada por los agricultores (Salhuana et al. 1998) y debido a los orígenes del germoplasma Blanco Dentado de Uruguay diferentes de los materiales de USA (Paterniani and Goodman 1977).

Las accesiones que integran la colección de maíz Blanco dentado de Uruguay presumiblemente son resultado de materiales que provienen de diferentes orígenes (Pérez Castellanos 1814, Boerger 1928, Paterniani and Goodman 1977), de la selección realizada por los productores durante décadas a favor de características agronómicas favorables (Salhuana et al. 1998) y de la acción de la selección natural intrínseca al ambiente en donde se cultiva. Todos estos factores actuando en conjunto y la deriva genética determinan el grado de estructuración poblacional reflejada en el agrupamiento obtenido en las accesiones de acuerdo a sus distancias genéticas y en los valores de G_{ST} entre accesiones. Los factores que afectan negativamente el nivel de estructuración genética son la existencia de flujo genético, producto de la práctica cultural ancestral de intercambio de semillas entre productores, y de la polinización cruzada entre accesiones cultivadas en campos cercanos, ya que el maíz es una especie alógama. El intercambio de semillas entre localidades, a su vez, explicaría la inexistencia de correlación entre la ubicación geográfica de las accesiones y la estructura genética, definida mediante la utilización de marcadores neutrales, no sometidos a la selección.

La estructura genética y la presencia de accesiones adaptadas a las condiciones locales explicarían el buen desempeño del compuesto racial elaborado a partir de la libre polinización de las 90 accesiones de la raza blanco dentado (Padrón y Lust 1986), ya que la combinación de materiales genéticamente distantes potencia la expresión de la heterosis (Schnable and Springer 2013, Paterniani and Goodman 1977). La colección de maíz Blanco Dentado uruguaya presenta variabilidad comparable con localidades que no corresponden al centro de origen del maíz (Eschholz et al. 2008). Tanto la diversidad como la estructura genética presentes en la colección posibilitaron la selección, a partir de la variabilidad preexistente, del 100% del germoplasma utilizado en la creación del cultivar Blanco Cangué, un

cultivar con buena tolerancia a la sequía y rendimientos comparables a los mejores híbridos (Vidal et al. 2009). La elevada diversidad fenotípica y genética con estructura más la acumulación de alelos favorables mediante selección artificial y natural explica el buen desempeño del germoplasma en el desarrollo del cultivar Blanco Cangué así como también el buen desempeño del compuesto racial elaborado a partir de la libre polinización de las 90 accesiones (Abadie et al. 1997).

La inexistencia de asociación entre la estructura genética y las distancias fenotípicas entre accesiones era esperable, dado que se trabajó con marcadores neutrales. Este hecho imposibilita la identificación de marcadores asociados a caracteres fenotípicos, y la selección indirecta a través de marcadores moleculares. Estudios más detallados como *genotyping by sequencing* (GBS), con alta densidad de marcadores del tipo SNP, serían más idóneos para la identificación de asociaciones con características fenotípicas, frecuentemente explicadas por alelos codificantes de expresión cuantitativa (Poland y Rife 2012).

Este trabajo demostró mediante marcadores moleculares la validez de la colección núcleo previamente establecida en base a características morfológicas. La colección núcleo está bien diseñada para fines de mejoramiento y conserva los alelos generalistas que estarían sometidos a la selección (Odong et al. 2013). Si se quisiera conservar todas las clases alélicas se debería utilizar una intensidad de selección mayor. La colección núcleo se podría usar como base en programas de mejoramiento, ya que es capaz de representar todos los grupos genéticos de la colección base. La metodología seguida en este trabajo puede ser extendida para validar la colección núcleo de las otras razas de la colección de variedades criollas de maíz de Uruguay (Malosetti y Abadie 2001), y analizar el nivel de representatividad (captura de alelos y de la estructura genética) en función de la intensidad de selección aplicada en diferentes razas.

La evaluación de la integridad de regeneraciones realizadas en México y en Uruguay, con las limitaciones de la muestra evaluada, mostró una alta fidelidad a nivel de alelos compartidos, aunque también la existencia de problemas en el mantenimiento de la totalidad de los alelos y sus frecuencias. Este resultado se corresponde con los obtenidos en trabajos realizados por Wen et al. (2011), Soengas

et al. (2009) y Malosetti et al. (1999). El ambiente de regeneración puede afectar la integridad de la muestra por efecto de selección, especialmente en ambientes diferentes a la localidad de origen. La adaptación a estreses específicos y diferencias en altitud y latitud pueden afectar la expresión de la floración, provocando selección, deriva genética, y apareamientos diferenciados (Wen et al. 2011; Reedy et al. 1995).

En definitiva, este trabajo evaluó la diversidad y estructura genética en la colección de maíz Blanco Dentado de Uruguay, con perspectivas para su uso en programas de mejoramiento, y brindó elementos para la conservación *ex situ* de la colección, a través de la evaluación de la colección núcleo y del proceso de regeneración.

4.

CONCLUSIONES

- La colección de maíz Blanco Dentado de Uruguay presenta una diversidad genética significativa, determinada mediante marcadores microsatélites, concordante con la alta diversidad fenotípica observada.
- La colección se estructura en cuatro grupos genéticos principales, determinados en base a las frecuencias génicas mediante diversas metodologías (agrupamiento de Ward, análisis canónico y análisis Bayesiano).
- La estructura genética de la colección no se correlaciona con la distribución geográfica, ni con el agrupamiento fenotípico en base a las distancias de Gower.
- La colección núcleo definida previamente en base a caracteres fenotípicos es validada mediante marcadores moleculares. La colección núcleo captura el 82% de las variantes alélicas, y representa la estructura genética de la colección base en cuatro grupos.
- La integridad genética de accesiones regeneradas en México y en Uruguay es alta en cuanto a la proporción de alelos compartidos, aunque se evidencian problemas en cuanto a alelos no compartidos entre las poblaciones regeneradas y las originales, así como en los cambios en las frecuencias alélicas.

5.

BIBLIOGRAFÍA

- Abadie T, Vivo G, Olveyra M. 1997. Uruguay LAMP final report. En: Salhuana W. et al. (eds). LAMP final report. Johnston, IA. Pioneer Hi-Bred Intl. Spec. Publ. G12083, 94–110
- Aci MM, Revilla P, Morsli A, Djemel A, Belalia N, Kadri Y, Khelifi-Saloui M, Ordás B, Khelifi L. 2013. Genetic diversity in Algerian maize (*Zea mays* L) landraces using SSR markers. *Maydica*, 58: 304-310
- Alesandri G. 2012. El maíz Blanco Cangüé para alimentación animal. Tesis Ingeniero Agrónomo. Montevideo, Facultad de Agronomía, Universidad de la República.
- Allard RW. 1992. Predictive methods for germplasm identification. In: Stalker HT, Murphy JP (Eds.). *Plant Breeding in the 1990's*. Wallingford, Oxon, UK: CAB International. 119–146.
- Altieri MA, Merrick LC. 1987. *In-situ* conservation of crop genetic resources through maintenance of traditional farming systems. *Economic Botany*, 41:86–96.
- Anderson E, Brown WL. 1952. Origin of corn belt maize and its genetic significance. En: Gowen JW (Ed.). *Heterosis*. Iowa State University Press. 124-148
- Anderson E. 1947. Field studies of Guatemalan maize. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 34(4): 433-467.
- Anderson E, Cutler HC. 1942. Races of *Zea mays*: I. Their recognition and classification. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 29:69- 88.
- Angioi SA, Rau D, Nanni L, Bellucci E, Papa R, Attene G. 2011. The genetic make of the European landraces of the common bean. *Plant Genetic Resources: characterization and Utilization*, 9(2): 197 – 201
doi:10.1017/S1479262111000190
- Arenares G, Quintana C, Rivero J. 2011. Efecto del tipo de mezcla forrajera sobre la productividad del segundo año. Tesis Ingeniero Agrónomo. Montevideo, Facultad de Agronomía, Universidad de la República

- Arteaga MC, Moreno-Letelier A, Mastretta-Yanes A, Vázquez-Lobo A, Breña-Ochoa A, Moreno-Estrada A, Eguiarte LE, Piñero D. 2016. Genomic variation in recently collected maize landraces from Mexico. *Genomics Data* 7: 38–45
- Balfourier F, Prospero JM, Charmet G, Goulard M, Monestiez P. 1999. Using spatial patterns of diversity to develop core collections. En: Johnson RC, Hodgkin T (Eds.). *Core collections for today and tomorrow*. Rome, Italy. International Plant Genetic Resources Institute. 37–48.
- Barreto P, Del Puerto P. 2001. Evaluación nutricional de verdes de verano. Tesis Ingeniero Agrónomo. Montevideo, Facultad de Agronomía, Universidad de la República
- Bedoya CA, Dreisigacker S, Hearne S, Franco J, Mir C, Prasanna BM, Taba S, Charcosset A, Warburton ML. 2017. Genetic diversity and population structure of native maize populations in Latin America and the Caribbean. *PLoS ONE* 12(4): e0173488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173488>
- Bedoya C. 2012. Estudios de diversidad genética en poblaciones de maíz (*Zea mays* L.) evaluadas con microsatélites. Ph.D. thesis. Palma de Mallorca. Universitat de les Illes Balears. 209p
- Belaj A, Dominguez-García M, Atienza S, Urdíroz N, De la Rosa R, Satovic Z, Martín A, Kilian A, Trujillo I, Valpuesta V, Del Río C. 2011. Developing a core collection of olive (*Olea europaea* L.) based on molecular markers (DArTs, SSRs, SNPs) and agronomic traits. *Tree Genetics and Genomes*. DOI 10.1007/s11295-011-0447-6
- Benz BF. 2006. Maize in the Americas. En: Staller JE, Tykot RH, Benz B. (Eds.). *Histories of maize: multidisciplinary approaches to the prehistory, linguistics, biogeography, domestication, and evolution of maize*. San Diego. Academic Press. 9-18.
- Beovide A, Caporale M, Beovide L. 2013. Propuesta de ordenamiento arqueológico de Ciudad del Plata. Intendencia M. de San José [En línea] Consultado 15.11.2016 Disponible en: www.imsj.gub.uy/portall5/images/stories/pdfs/oa2013.pdf.

- Berg EE, Hamrick JL. 1997. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Canadian Journal of Forest Research* 27:415–424.
- Berretta A, Condon F, Rivas M. 2007. Segundo informe país sobre el estado de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Montevideo, Uruguay. MGAP. 120p
- Berro MB. 1975 *La Agricultura Colonial*. Ministerio de Educación y Cultura. Montevideo, Uruguay. 356 p.
- Blacket MJ, Robin C, Good RT, Lee SF, Miller AD. 2012. Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Molecular Ecology Resources*, 12: 456–463. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03104.x
- Boerger A. 1928. Observaciones sobre agricultura: quince años de trabajos fitotécnicos en Uruguay. [Agricultural notes: Fifteen years of crop breeding in Uruguay] Montevideo, Uruguay. 436p
- Börner A, Chebotar S, Korzun V. 2000. Molecular characterization of the genetic integrity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm after long-term maintenance. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 494–497
- Bourguiba H, Krichen L, Audergon JM, Khadari B, Trifi-Farah N. 2010. Impact of mapped SSR markers on the genetic diversity of apricot (*Prunus armeniaca* L.) in Tunisia. *Plant Molecular Biology Reporter*, 28: 578-587
- Bracco M, Cascales J, Cámara-Hernández J, Poggio L, Gottlieb AM, Lia V. 2016. Dissecting maize diversity in lowland South America: genetic structure and geographic distribution models. *BMC Plant Biology*, 16(1): 186. doi: 10.1186/s12870-016-0874-5
- Brandolini A, Brandolini A. 2001. Classification of Italian maize (*Zea mays* L.) germplasm. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 126: 1-11.
- Bretting PK, Goodman MM, Stuber CW. 1990. Isozymatic variation in Guatemalan races of maize. *American Journal of Botany*, 77: 211-225
- Brieger FG, Gurgel JTA, Paterniani E, Blumenschein A, Alleoni MR. 1958. Races of Maize in Brazil and other Eastern South American countries. Washington, D.C, National Academy of Science—National Research Council, Publication 593.

- Brown AHD 1989a. The case for core collections. En: Brown AHD, Frankel OH, Marshal DR (Eds.). The use of plant genetic resources. Cambridge. University Cambridge Press. 136-156
- Brown AHD. 1989b. Core collections: a practical approach to genetic resources management. *Genome* 31: 818-824
- Brown AHD. 1978. Isozymes, plant population genetics structure and genetic conservation. *Theoretical and Applied Genetics*, 52: 145–157
- Brown AHD, Spillane C. 1999. Implementing core collections principles procedures, progress, problems and promise. En Johnson RC and Hodgkin T. (Eds.). Core collections for today and tomorrow. Rome, Italy. International Plant Genetic Resources Institute. 1–9.
- Brown WL, Goodman MM. 1977. Races of corn. En: Sprague GF (Ed.). Corn and Corn Improvement. Madison, Wisconsin, U.S.A. American Society of Agronomy. Inc. Publisher. Series Agronomy Number 18. 49-88.
- Brush SB (Ed.). 1999. Genes in the field: On-Farm conservation of crop diversity. Ottawa, Ontario - Canada. IDRC/IPGRI/Lewis Publishers. 1–300.
- Brush SB. 1991. A farmer-based approach to conserving crop germplasm. *Economic Botany*, 39: 310–325.
- Camacho TC, Maxted N, Scholten M, Ford-Lloyd B. 2005. Defining an identifying crop landraces. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 3: 373-384.
- Ceretta S et al. 1997. Informe presentado a la Comisión Asesora de Certificación de Semillas: Sector Cereales de Verano Maíz. La Estanzuela-Uruguay. INIA. 47p
- Charcosset A, Moreau L. 2004. Use of molecular markers for the development of new cultivars and the evaluation of genetic diversity. *Euphytica*, 137: 81-94
- Chebotar S, Röder MS, Korzun V, Saal B, Weber WE, Börner A. 2003. Molecular studies on genetic integrity of open pollinating species rye (*Secale cereale* L.) after long-term genebank maintenance. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 1469–1476
- Choukan R, Hossainzadeh A, Ghannadha MR, Talei AR, Mohammadi SA, Warburton ML. 2006. Use of SSR data to determine relationships and potential

- heterotic groupings within medium to late maturing Iranian maize inbred lines. *Field Crops Research*, 95: 212–222.
- CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo). 2005. Laboratory protocols. Applied molecular genetics laboratory (3rded). Mexico DF. CIMMYT 81p
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB and Pang ECK. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142: 169–196 doi: 10.1007/s10681-005-1681-5
- Cömertpay G, Baloch FS, Kilian B, Ülger AC, Özkan H. 2011. Diversity assessment of Turkish maize landraces based on fluorescent labelled SSR markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30: 261-274. doi: 10.1007/s11105-011-0332-3
- Corrado G, Caramante M, Piffanelli P, Rao R. 2014. Genetic diversity in Italian tomato landraces: Implications for the development of a core collection. *Scientia Horticulturae* 168: 138–144
- Crossa J, Taba S, Eberhart SA, Bretting P and Vencovsky R. 1994. Practical considerations for maintaining germplasm in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 89–95
- Crossa J, Hernandez CM, Bretting P, Eberhart SA, and Taba S. 1993. Statistical considerations for maintaining germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics*, 86: 673–678.
- Crossa J. 1989. Methodologies for estimating the sample size required for genetic conservation of outbreeding crops. *Theoretical and Applied Genetics*, 77: 153–161.
- de Almeida Silva NC, Vidal R, Ogliari JB. 2016. New popcorn races in a diversity microcenter of *Zea mays* L. in the Far West of Santa Catarina, Southern Brazil. *Genetic Resources and Crop Evolution*: 1-14 doi:10.1007/s10722-016-0429-5
- De María F, Fernández GM, Zoppolo JC. 1979. Caracterización agronómica y clasificación racial de las muestras de maíz coleccionadas en Uruguay bajo el proyecto I.B.P.G.R (International Board for Plant Genetic Resources). B.Sc. Thesis. Montevideo. Facultad de Agronomía, Universidad de la República

- Diwan N, McIntosh MS, Bauchan GR. 1995. Methods of developing a core collection of annual *Medicago* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 755–761
- Doebley JF, Iltis HH. 1980. Taxonomy of *Zea* (Gramineae). I. A subgeneric classification with key to taxa. *American Journal of Botany*, 67(6):982-993.
- Doebley JF. 1990. Molecular evidence and the evolution of maize. *Economic Botany*, 44 (supplement):6-27.
- Dowswell CD, Paliwal RL, Cantrell RP. 1996. *Maize in the third world*. Boulder, CO, USA, Westview Press. 268p
- Dubreuil P, Warburton ML, Chastanet M, Hoisington D, Charcosset A. 2006. More on the introduction of temperate maize into Europe: large-scale bulk SSR genotyping and new historical elements. *Maydica*, 51: 281-291
- Dubreuil P, Rebourg C, Merlino M, Charcosset A. 1999. The DNA pooled sampling strategy for estimating RFLP diversity of maize population. *Plant Molecular Biology Report*, 17:123–138
- Eschholz TW, Stamp P, Peter R, Leipner J, Hund A. 2010. Genetic structure and history of Swiss maize (*Zea mays* L. ssp. *mays*) landraces. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57: 71-84
- Eschholz TW, Peter R, Stamp P, Hund A. 2008. Genetic diversity of Swiss maize (*Zea mays* L) assessed with individual and bulks on agarose gel. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55: 971-983
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005 Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587
- FAO. 1997. Report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Prepared for the international technical conference on plant genetic resources, Leipzig, Germany

- Fernández G, Frutos E, Maiola C. 1983. Catálogo de recursos genéticos de maíz de Sudamérica-Uruguay. Pergamino, Argentina. EERA-Pergamino INTA CIRF.
- Ferrer ME. 2009 Aporte de las razas locales en el mejoramiento de maíz de América Latina y el Caribe. Simposio de Recursos Genéticos de América Latina y el Caribe. Proceedings T 1: 77-79
- Franco J, Warburton M, Dubreuil P, Dreisigacker S. 2005. User's manual for the FREQS-R program for estimating allele frequencies for fingerprinting and genetic diversity studies using bulked heterogeneous populations. México, DF. CIMMYT(Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo). 6p.
- Franco J, Crossa J, Ribaut JM, Bertran J, Warburton ML, Khairallah M. 2001. A method for combining molecular markers and phenotypic attributes for classifying plant genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*, 103:944-952
- Freitas FO, Bendel G, Allaby RG, Brown TA. 2003. DNA from primitive maize landraces and archaeological remains: implications for the domestication of maize and its expansion into South America. *Journal of Archaeology Science*, 30:901–908.
- Galván G, González H, Vilaró F. 2005. Estado actual de la investigación en poblaciones locales de hortalizas en Uruguay y su utilización en el mejoramiento. *Agrociencia Uruguay*, 9(1-2):115-122.
- Galván G, González H. 1992. Prospect for onion breeding in Uruguay. *Onion Newsletter for the Tropics*, 4:24-25
- González H. 1999. Pérdida y recuperación de cultivos hortícolas en el Uruguay. *GRAIN Biodiversidad* 21 (junio 1999).
- Goodman MM. 2005. Broadening the U.S. maize germplasm base. *Maydica*, 50: 203-214
- Goodman MM, Brown WL. 1988. Races of corn. En: Sprague GF, Dudley JW (Eds.). *Corn and corn improvement*. Madison, Wisconsin, USA. ASA, CSSA, SSSA publishers. Third edition. 33-79
- Goodman MM, Stuber CW. 1983. Races of maize. VI. Isozyme variation among races of maize in Bolivia. *Maydica*, 28: 169-187

- Goodman MM, Bird RMCK. 1977. The races of maize: IV. Tentative grouping of 219 Latin American races. *Economy Botany*, 31: 204-221
- Goodman MM. 1976. Maize. En: Simmonds N.W (Ed.). *Evolution of Crop Plants*. New York. Longman Inc. 128–136.
- Goodman MM, Paterniani E. 1969. The races of maize: III. Choices of appropriate characters for racial classification. *Economy Botany*, 23: 265-273
- Goodman MM. 1967. The races of maize. The use of Mahalanobis' generalized distances to measure morphological similarity. *Fitotecnia Latinoamericana* 4: 1-22
- Gore MA, Chia JM, Elshire RJ, Sun Q, Ersoz ES, Hurwitz BL, Peiffer JA, McMullen MD, Grills GS, Ross-Ibarra J, Ware DH, Buckler ES. 2009. A first-generation haplotype map of maize. *Science*, 326: 1115–1117
- Gower JC. 1971. A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics*, 27:857–874.
- Grant UJ, Hatheway WH, Timothy DH, Cassalet CD, Roberts LM. 1963. Races of maize in Venezuela. Washington, D. C. National Academy of Sciences—National Research Council. Publication 1136. 92p
- Grobman A, Salhuana W, Sevilla R, in collaboration with Mangelsdorf PC. 1961. Races of Maize in Peru. Washington, D. C. National Academy of Sciences—National Research Council. Publication 915. 374p.
- Gutiérrez L, Franco J, Crossa J, Abadie T. 2003. Comparing a preliminary racial classification with a numerical classification of the maize landraces of Uruguay. *Crop Science*, 43: 718-727.
- Hambling MT, Warburton ML, Buckler ES. 2007. Empirical comparison of simple sequence repeats and single nucleotide polymorphisms in assessment of maize diversity and relatedness. *PloS One* 2(12): e1367
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4(1): 9p.
- Hamrick JL, Godt MJW. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 351(1345): 1291-1298

- Hartings H, Berardo N, Mazzinelli GF, Valoti P, Verderio A, Motto A. 2008. Assessment of genetic diversity and relationships among maize (*Zea mays* L.) Italian landraces by morphological traits and AFLP profiling. *Theoretical and Applied Genetics*, 117: 831-842.
- Herrera CBE, Castillo GF, Sánchez CJJ, Hernández CJM, Ortega PRA. 2004. Diversidad del maíz Chalqueno. *Agrociencia* 38: 191-206
- Hidalgo KVP, Méndez-Marroquín KP, Alvarez EV, Chávez-Ontiveros J, Sánchez-Peña P, Garzón-Tiznado JA, Vega-García MO, López-Valenzuela JA. 2013. Microsatellite-based genetic diversity among accessions of maize landraces from Sinaloa in México. *Hereditas*, 150: 53–59
- Hijmans RJ, Guarino L, Cruz M, Rojas E. 2001. Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. DIVA-GIS. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 127: 15-19
- Ignjatovic-Micic D, Drinic S.M, Nikolic A, Jancic VL. 2008. SSR-analysis for genetic structure and diversity determination of maize local populations from former Yugoslavia territories. *Russian Journal of Genetics*, 44(11): 1317–1324
- Iltis HH and Benz BF 2000. *Zea nicaraguensis* (Poaceae), a new teosinte from pacific coastal Nicaragua, *Novon* 10 (4): 382–390.
- Iltis HH and Doebley JF. 1980. Taxonomy of *Zea* (*Gramineae*). II. Subspecific categories in the *Zea mays* complex and a generic synopsis. *American Journal of Botany*, 67 (6): 994–1004.
- Iriarte J, Holst I, Marozzi O, Listopad C, Alonso E, Rinderknecht A, Montaña J. 2004. Evidence for cultivar adoption and emerging complexity during the mid-Holocene in the La Plata basin. *Nature* 432(7017), 614-617.
- Kato TA, Mapes C, Mera LM, Serratos JA, Bye RA. 2009. Origen y diversificación del maíz, una revisión analítica. México: UNAM-CONABIO. 115 p.
- Kato TA. 2005. Cómo y dónde se originó el maíz. *Investigación y Ciencia*, 347: 68-72.
- Kato TA. 1984. Chromosome morphology and the origin of maize and its races. *Evolutionary Biology*, 17: 219-253.

- Kist V. 2010. Análise do potencial genético de população composta de milho mediante esquema modificado de seleção recorrente de famílias de meio-irmãos. Tese Doutorado Univ. Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 241 p.
- Legesse BW, Myburg AA, Pixley KV, Botha AM. 2007. Genetic diversity of African maize inbred lines revealed by SSR markers. *Hereditas*, 144:10-17
- Lia V, Poggio L, Confalonieri V (2009) Microsatellite variation in maize landraces from Northwestern Argentina: genetic diversity, population structure and racial affiliations. *Theoretical and Applied Genetics*, 119: 1053-1067
- Liu Z, Guo R, Zhao J, Cai Y, Wang F, Cao M, Wang R, Shi Y, Song Y, Wang T, Li Y. 2009. Genetic Diversity of Two Important Groups of Maize Landraces with Same Name in China Revealed by M13 Tailed-Primer SSRs. *Agricultural Sciences in China*, 8: 15-23
- Liu K, Goodman M, Muse S, Smith JS, Buckler E, Doebley J. 2003. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. *Genetics*, 165: 2117–2128
- Llauradó M, Moreno-Gonzalez J. 1993. Classification of northern Spanish populations of maize by methods of numerical taxonomy. I. Morphological traits. *Maydica*, 38:15-21
- Louette D, Charrier A, Berthaud J. 1997. *In situ* conservation of maize in Mexico: genetic diversity and maize seed management in a traditional community. *Economic Botany* 51: 20–38.
- Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM, Sherwin WB. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity*, 89(3): 238-247. doi:10.1093/jhered/89.3.238
- Malosetti M, Abadie T. 2001. Sampling strategy to develop a core collection of Uruguayan maize landraces based on morphological traits. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48: 381-390
- Malosetti M, Capdevielle F, Branda A, Abadie T, Condón F. 1999. Evaluación molecular de la regeneración de la colección uruguaya de maíz. En: Puignau JP.

- (Ed.). Avances de investigación en recursos genéticos en el Cono Sur. Montevideo. PROCISUR. 79-82.
- Marita JM, Rodriguez JM, Nienhuis J. 2000. Development of an algorithm identifying maximally diverse core collections. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47(5): 515–526
- Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, Sánchez J, Buckler E, Doebley J. 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9): 6080-6084.
- Maxted N, Hawkes JG, Ford-Lloyd BV, Williams JT. 1997. A practical model for *in situ* genetic conservation – complementary conservation strategies. En: Maxted N, Ford-Lloyd BV, Hawkes JG (Eds.) *Plant genetic conservation*. London: Chapman and Hall. 339-367.
- McClintock B. 1978. Significance of chromosome constitutions in tracing the origin and migration of races of maize in the Americas. En: Walden DB. (Ed.). *Maize Breeding and Genetics*. New York. John Wiley and Sons. 159-184.
- McClintock B, Kato TA, Blumenschein A. 1981. *Chromosome Constitution of Races of Maize. Its Significance in the Interpretation of Relationships between Races and Varieties in the Americas*. Chapingo, Mexico. Colegio de Postgraduados. (No. 04; CP, QH470 M3.)
- Medina M, Abadie T, Valoró D y Ceretta S. 2001. Estudio metodológico de adaptación de cultivares de maíz para silo a las condiciones de Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 1: 23-31
- Mehta CR, Patel NR, Tsiatis AA (1984) Exact significance testing to establish treatment equivalence with ordered categorical data. *Biometrics*, 40: 819–825
- Melchinger AE. 1999. Genetic diversity and heterosis. En Coors JG, Pandey S. (Eds.). *The genetics and exploitation of heterosis in crops*. Madison. ASA, CSSA, and SSSA. 99–118.
- Monfreda C, Ramankutty N, Foley J A. 2008. *Farming the planet: 2. Geographic distribution of crop areas, yields, physiological types, and net primary*

- production in the year 2000, *Global Biogeochem. Cycles*, 22, GB1022, doi:10.1029/2007GB002947.
- Monteverde E, Galván GA, Speranza P. 2015. Genetic diversification of local onion populations under different production systems in Uruguay. *Plant Genetic Resources*, 13(3): 238-246
- Nagy S, Poczai P, Cernák I, Gorji AM, Hegedús G and Taller J. 2012. PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemical Genetics*, 50: 670-672. Available at: <http://w3.georgikon.hu/pic/kezi.aspx>
- Nas LL, Paterniani E. 2000. Perspectivas do melhoramento do milho. En: Udry W, Duarte W. (Eds.). *Uma história brasileira do milho - o valor dos recursos genéticos*. Paralelo 15. 43-64
- Nei M. 1982. Evolution of human races at the gene level. En: Bonné-Tamir BP, Cohen P, Goodman R. (Eds.). *Human Genetics, Part A, the unfolding genome*. New York. Liss AR. 167-181
- MGAP-DIEA (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca - Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2013. Encuesta agrícola Invierno 2013. Serie Encuestas, 315. 20p.
- Noldin Almiron OJ. 2008. Análisis multivariante de la colección nuclear de la raza Avati Morotí de Paraguay. DEA en agronomía. España. Universidad de Vigo.
- Odong TL, Jansen J, van Eeuwijk FA, van Hintum TJJ. 2013. Quality of core collections for effective utilization of genetic resources: review, discussion and interpretation. *Theoretical and Applied Genetics*, 126: 289-305. doi:10.1007/s00122-012-1971-y
- Ortega-Paczka R. 2003. La diversidad del maíz en México. En: Esteva G, Marielle C (Eds), *Sin maíz no hay país*. México. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, Dirección General de Culturas Populares. pp 123–154.
- Ozer Ami H, Suarez R, Abadie T. 2004. Elaboración de una colección núcleo para la colección de germoplasma de maíz de la raza Blanco Dentado. *Agrociencia Uruguay*, 1: 1-10

- Padrón MA, Lust AA. 1986. Efecto de la población y la fertilización nitrogenada en la producción de grano y forraje para silo en dos cultivares de maíz. B.Sc. Thesis. Montevideo, Facultad de Agronomía, Universidad de la República
- Paterniani E, Goodman MM. 1977. Races of maize in Brazil and adjacent areas. México, D.F. CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo).No. Folleto 9434.
- Paterniani E, Lonquist JH. 1963. Heterosis in inter-racial crosses of corn (*Zea mays* L.). *Crop Science* 3: 504-507
- Pejic I, Ajimone-Marsan P, Morgante M, Kozumplick V, Castiglione P, Taramino G, Motto M. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 1248-1255.
- Perales H, Golicher D. 2014. Mapping the diversity of maize races in Mexico. *PLoS one*, 9(12): e114657
- Pérez Castellano JM (1814) Observaciones sobre agricultura, 1814. In: Selección de escritos. Biblioteca Artigas, 1968 (Clásicos Uruguayos, Vol. 131). Ministerio de Cultura. [En línea] Consultado 15.11.2016. http://www.rapaluguay.org/publicaciones/Observaciones_sobre_Agricultura.html
- Poland JA, Rife TW. 2012. Genotyping-by-sequencing for plant breeding and genetics. *The Plant Genome*, 5(3): 92-102.
- Porta B, Antúnez MJ, Olaizola J, Vidal R. 2013. Identificación y análisis de diversidad de variedades criollas de maíz conservadas *in situ – on farm* en Tacuarembó, Uruguay. Acajutla-El Salvador. IX Simposio Internacional de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe, p. 35
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238
- Prasanna BM. 2012 Diversity in global maize germplasm: Characterization and utilization. *Journal of Biosciences*, 37 843–855. DOI 10.1007/s12038-012-9227-

- Prasanna BM. 2010. Phenotypic and molecular diversity of maize landraces: characterization and utilization. *Indian Journal of Genetics*, 70: 315–327
- Prasanna BM, Pixley KV, Warburton M, Xie C. 2010. Molecular marker assisted breeding for maize improvement in Asia. *Molecular Breeding*, 26: 339-356
- Prasanna BM, Singode A, Garg A, Kumar R, Singh BB. 2007 Molecular characterization of maize genetic resources in India: present status and prospects. En: Pixley K, Zhang SH (Eds.). Beijing, China. Proceedings of the ninth Asian regional maize workshop. pp 40-43
- Pressoir G, Berthaud J. 2004a. Patterns of population structure in maize landraces from the Central Valleys of Oaxaca in Mexico. *Heredity*, 92: 88–94.
- Pressoir G, Berthaud J. 2004b. Population structure and strong divergent selection shape phenotypic diversification in maize landraces. *Heredity*, 92: 95–101.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- R Development Core Team. 2013. R: a language and environment for statistical computing. Vienna. R Foundation for Statistical Computing (<http://www.R-project.org>)
- Ramírez ER, Timothy DH, Díaz EB, Grant UJ, in collaboration with Nicholson GE, Anderson E, Brown WL 1960. Races of Maize in Bolivia. Washington, D. C. National Academy of Sciences—National Research Council. Publication 747. 159 p.
- Ramos JF, Triay S, Uteda A. 2013. Aptitud pastoril y de calidad forrajera de diferentes cultivares de maíz. Tesis Ingeniero Agrónomo. Montevideo, Facultad de Agronomía, Universidad de la República.
- Rebourg C, Gouesnard B, Charcosset A. 2001. Large scale molecular analysis of traditional European maize populations: relationships with morphological variation. *Heredity*, 86: 574-587
- Reedy ME, Knapp AD, Lamkey KR. 1995. Isozyme allelic frequency changes following maize (*Zea mays* L.) germplasm regeneration. *Maydica*, 40: 269-273
- Reif JC, Warburton ML, Xia XC, Hoisington DA, Crossa J, Taba S, Muminović J, Bohn M, Frisch M, Melchinger AE. 2006. Grouping of accessions of Mexican

- races of maize revisited with SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 113: 177 – 185.
- Reif JC, Hamrit S, Heckenberger M, Schipprack W, Peter Maurer H, Bohn M, Melchinger AE. 2005a. Genetic structure and diversity of European flint maize populations determined with SSR analysis of individual and bulks. *Theoretical and Applied Genetics*, 111: 906-913
- Reif JC, Melchinger AE, Frisch M. 2005b. Genetical and mathematical properties of similarity and dissimilarity coefficients applied in plant breeding and seed bank management. *Crop Science* 45(1): 1-7
- Reif JC, Xia XC, Melchinger AE, Warburton ML, Hoisington DA, Beck D, Bohn M, Frisch M. 2004. Genetic diversity determined within and among CIMMYT maize populations of tropical, subtropical, and temperate germplasm by SSR markers. *Crop Science*, 44: 326-334
- Rice EB, Smith ME, Mitchell SE, and Kresovich S. 2006. Conservation and change: a comparison of *in situ* and *ex situ* conservation of Jala maize germplasm. *Crop Science*, 46: 428–436
- Ristić D, Babić V, Anđelković V, Vančetović J, Mladenović Drinićand S, Ignjatović Micić D. 2013. Genetic diversity in maize dent landraces assessed by morphological and molecular markers. *Genetika*, 45(3): 811-824
- Rivas M, Condón F. 2015. Plant domestication and utilization: the case of the Pampa Biome. En: Al-Khayri JM, Mohan Jain S, Johnson DV (Eds.). *Advances in plant breeding strategies: breeding, biotechnology and molecular tools*. Springer International Publishing. (v.1). 3-24
- Roberts EH. 1975. Problems of long-term storage of seed and pollen for genetic resources conservation. En Frankel OH, Hawkes JG, (Eds.). *Crop genetic resources for today and tomorrow*. Cambridge, England. Cambridge Univ.Press. 269-296.
- Roberts LM, Grant UC, Ramírez ER, Hatheway WH, Smith DL, in collaboration with Mangelsdorf PC. 1957. *Races of maize in Colombia*. Washington, D. C. National Academy of Sciences-National Research Council. Publication 510.153p.

- Roldán-Ruiz I, van Eeuwijk FA, Gilliland TJ, Dubreuil P, Dillmann C, Lallemand J, De Loose M, Baril CP. 2001. A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 1138-1150
- Rosegrant MR, Ringler C, Sulser TB, Ewing M, Palazzo A, Zhu T. 2009. Agriculture and food security under global change: Prospects for 2025/2050. Background note for supporting the development of CGIAR Strategy and Results Framework. Washington, D.C.: International Food Policy Research Institute. 81p
- Saeed A, Hovsepyan H, Darvishzadeh R, Imtiaz M, Panguluri SK, Nazaryan. 2011. Genetic diversity of Iranian accession, improved lines of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and their wild relatives using simple sequence repeats. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29(4): 848-858. doi:10.1007/s11105-011-0294-5
- Salhuana W, Pollak LM, Ferrer M, Paratori O, Vivo G. 1998. Breeding potential of maize accessions from Argentina, Chile, USA, and Uruguay. *Crop Science*, 38: 886-872
- Sánchez GJJ. 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, 2.
- Sánchez GJ, Goodman MM, and Stuber CW. 2000. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Economic Botany*, 54(1):43-59.
- Sánchez JJ, Goodman MM. 1992. Relationships among the Mexican races of maize. *Economic Botany*, 46:72-85
- Schnable PS, Springer NM. 2013. Progress toward understanding heterosis in crop plants. *Annals Review of Plant Biology*, 64, 71-88
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18: 233-234

- Serna-Saldívar SO, Gómez MH, Rooney LW. 1994. Food uses of regular and specialty corns and their dry-milled fractions. In Hallauer AR. (Ed.). Specialty corns. FL, USA, CRC Press. p. 263-298
- Sharma L, Prasanna BM, Ramesh B. 2010. Analysis of phenotypic and microsatellite-based diversity of maize landraces in India, especially from the North East Himalayan region. *Genetica*, 138: 619-631. doi:10.1007/s10709-010-9436-1
- Schlötterer C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109:365–371 doi:10.1007/s004120000089
- Smith JSC, Smith OS. 1992. Fingerprinting crop varieties. *Advances in Agronomy*, 47: 85-140
- Soengas P, Cartea E, Lema M, Velasco P. 2009. Effect of regeneration procedures on the genetic integrity of *Brassica oleracea* accessions. *Molecular Breeding* 23(3): 389–395
- Taba S, Twumasi-Afriyie S. 2008 Regeneration guidelines: maize. En: Dullo ME, Thormann I, Jorge MA, Hanson J (Eds.). Crop-specific regeneration guidelines. (Rome: CGIAR System wide Genetic Resource Programme) [CD-ROM]
- Taba S, van Ginkel M, Hoisington D, Poland D. 2004 Wellhausen-Anderson: Plant Genetic Resources Center: Operations manual. México. CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo)
- Teshome A, Baum BR, Fahrig L, Torrance JK, Arnason TJ, Lambert JD. 1997. Sorghum (*Sorghum bicolor*) landrace variation and classification in North Shewa and South Welo, Ethiopia. *Euphytica*, 97: 255–263.
- Timothy DH, Hatheway WH, Grant UJ, Torregroza C, Sarria V, Varela A. 1963. Races of Maize in Ecuador. Washington, D. C. National Academy of Sciences—National Research Council. Publication. 975. 147 p.
- Timothy DH, Peña V, Ramírez E, in collaboration with Brown WL, Anderson E. 1961. Races of Maize in Chile. Washington, D. C. National Academy of Sciences—National Research Council. Publication. 847. 84 p.
- Thormann CE, Ferreira ME, Camargo LEA, Tivang JG and Osborn TC. 1994. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships

- within and among cruciferous species. *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 973-980.
- van Hintum TJJ, Brown AHD, Spillane C, Hodgkin T. 2000. Core collections of plant genetic resources. Roma, International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Bioversity International. Technical Bulletin 3.
- van Hintum TJJ. 1999. The general methodology for creating a core collection. En: Johnson RC, Hodgkin T. (Eds.). Core collections for today and tomorrow. Rome, Italy. International Plant Genetic Resources Institute. 10–17.
- van Heerwaarden J, Hellin J, Visser RF, van Eeuwijk FA. 2009. Estimating maize genetic erosion in modernized small holder agriculture. *Theoretical and Applied Genetics*, 119: 875–888.
- Vidal R. 2016. Diversidade das populações locais de milho de Anchieta e Guaraciaba, Oeste de Santa Catarina: Múltiplas abordagens para sua compreensão. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 190 p
- Vidal R, Porta B, Alessandri G. 2011. Conservación de las variedades locales de maíz Blanco Dentado en Uruguay. Quito, Ecuador. VIII Simposio de recursos genéticos de América Latina y el Caribe (Anales). p.190-192.
- Vidal R, Bellenda F, Estramil E, Fernández G, Lafluf P, Oliveira M, Ozer Ami H, Vivo G. 2009. Obtención de una variedad de polinización abierta de maíz exitosa a partir de germoplasma local. Pucón, Chile. VII Simposio de recursos genéticos para América Latina y el Caribe. Proceeding Tomo I. p.495-496.
- Vigouroux Y, Glaubitz JC, Matsuoka Y, Goodman MM, Sánchez J, Doebley J. 2008. Population structure and genetic diversity of new world maize races assessed by DNA microsatellites. *American Journal of Botany*, 95(10): 1240-1253. doi: 10.3732/ajb.0800097. PMID:21632329
- Vilaró M. 2013. Estudio de la diversidad genética de colecciones de maíz (*Zea mays* L.) del cono sur de América. M.Sc. Tesis. Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias.
- Warburton M, Setimela P, Franco J, Cordova H, Pixley K, Banziger M, Dreisigacker S, Bedoya C, MacRobert J. 2010. Towards a cost-effective fingerprinting

- methodology to distinguish maize open-pollinated varieties. *Crop Science*, 50: 467–477.
- Warburton ML, Xianchun X, Crossa J, Franco J, Melchinger AE, Frisch M, Bohn M, Hoisington D. 2002. Genetic characterization of CIMMYT inbred maize lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods. *Crop Science*, 42: 1832-1840
- Ward J, 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, 58(301): 236-244.
- Wen W, Franco J, Chavez-Tovar VH, Yan J, Taba S. 2012. Genetic characterization of a core set of a tropical maize race Tuxpeño for further use in maize improvement. *Plos One*, 7(3): e32626. doi:10.1371/journal.pone.0032626
- Wen W, Taba S, Shah T, Tovar VHC, Yan J. 2011. Detection of genetic integrity of conserved maize (*Zea mays* L.) germplasm in genebanks using SNP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 58: 189–207
- Winter P, Kahl G. 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(4): 438-448.
- Wood D, Lenne J. 1997. The conservation of agrobiodiversity on-farm: Questioning the emerging paradigm. *Biodiversity and Conservation*, 6(1): 109-129.
- Wright S. 1978. *Evolution and the genetics of populations: a treatise in four volumes: Vol.4: Variability within and among natural populations*. Chicago, University of Chicago Press. 580p.
- Xia X, Reif J, Hoisington D, Melchinger A, Frisch M, Warburton M. 2004. Genetic diversity among CIMMYT maize inbred lines investigated with SSR markers: I. Lowland tropical maize. *Crop Science*, 44: 2230-2237
- Xin-Hai L, Xian-De L, Ming-Shun Li, Shi-Huang Z. 2003. Identification of quantitative Trait Loci for Anthesis-Silking Interval and Yield Components Under Drought Stress in Maize. *Acta Botanica Sinica*, 45(7): 852-857.
- Yao Q, Fang P, Kang K, Pan G. 2008. Genetic diversity based on SSR markers in maize (*Zea mays* L.) landraces from Wuling mountain region in China. *Journal of Genetics*, 87(3): 287-291.

- Yang X, Xu Y, Shah T, Li H, Han Z, Li J, Yan J. 2011. Comparison of SSRs and SNPs in assessment of genetic relatedness in maize. *Genetica* 139(8):1045-1054
- Yu JM, Zhang ZW, Zhu CS, Tabanao DA, Pressoir G, Tuinstra MR, Kresovich S, Todhunter RJ, Buckler ES. 2009. Simulation appraisal of the adequacy of number of background markers for relationship estimation in association mapping. *The Plant Genome* 2: 63–77.
- Zeven AC. 1998. Landraces: a review of definitions and classifications. *Euphytica* 104: 127-139.
- Zhu Y, Chen H, Fan J, Wang Y, Cheng J, Fan J X, Yang S, Hu L, Leng H, Mew T W, Teng PS, Wang Z, Mundt CC. 2000. Genetic diversity and disease control in rice. *Nature*, 406: 718–722.

6.

ANEXOS

6.1 SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material S1

List of White Dent (*Blanco Dentado*) maize accessions collected in Uruguay in 1979, locations and the estimated coordinates.

Identification numbers for the accessions		Location and estimated coordinates		
URZM	URGY	Department, place, route and kilometre	Latitud (dec)	Longitud (dec)
1001	8105	Canelones, Los Cerrillos, R.36 Km 29.5	-34.624318	-56.341718
1002	8106	Canelones, Los Cerrillos, R.36 Km 35	-34.61087	-56.363833
1003	3140	Canelones, Melilla, R.36 and R.5	-34.762868	-56.265796
1004	8107	Canelones, Canelones, R.46 Km 47.5	-34.564685	-56.330216
1005	3143	Canelones, Canelones, R.46 Km 45	-34.564685	-56.330216
1006	3144	Canelones, Santa Lucía, R.11 Km 73	-34.495679	-56.368103
1007	8108	Canelones, Santa Lucía, R.11 Km 57.5	-34.461753	-56.379261
1008	8109	Canelones, Santa Lucía, R.11 Km 63.2	-34.44367	-56.413229
1009	3147	Canelones, Santa Lucía, R.81 Km 1.7	-34.452375	-56.353426
1010	3149	Canelones, Santa Lucía, R.11 Km 42.5	-34.47916	-56.375699
1011	3150	San José, Bella Vista, R.11 Km 27	-34.317505	-56.999314
1012	8110	Canelones, Pando, R.34 Km 41	-34.693811	-55.983123
1013	3152	Canelones, Canelón Chico, R.32 Km 17	-34.645869	-56.193461
1014	3153	Canelones, Canelón Chico, R.32 Km 37	-34.635693	-56.175842
1015	3154	Canelones, San Ramón, R.6 Km 76.5	-34.302444	-55.962832
1016	8111	Canelones, Sauce, R.6 Km 30.5	-34.635006	-56.053668
3001	8112	Rocha, Ruta 109	-34.363636	-54.530445
3002	3157	Rocha, Ruta 109	-34.354311	-54.404693
5001	8125	Cerro Largo, Las Toscas, Ruta 26, 120 Km desde Tacuarembó	-32.317327	-54.612016
5002	8126	Cerro Largo, camino a Mangrullo 15 Km desde Ruta 8	-32.115835	-54.068246
5003	8127	Cerro Largo, camino a Mangrullo 17 Km desde Ruta 8	-32.094361	-54.05663

Cont. Table S1

Identification numbers for the accessions		Location and estimated coordinates		
URZM	URGY	Department, place, route and kilometre	Latitud (dec)	Longitud (dec)
5004	8128	Cerro Largo, Cuchilla de Melo	-31.948379	-54.08551
6001	8121	Rivera, Paraje Manuel Díaz	-31.522267	-55.555162
6002	8122	Rivera, Minas de Corrales, R.28	-31.558533	-55.468683
6003	8124	Rivera, R.28 Km 3	-31.536297	-55.46834
9001	3690	Paysandú, Parada Esperanza, R.90 Km 58	-32.390643	-57.397604
10001	8148	Rio Negro, San Javier	-32.665696	-58.12362
11001	8129	Soriano, R.21 Km 340	-33.369534	-58.090444
11002	3175	Soriano, La Tabla	-33.529712	-58.190975
11003	8130	Soriano, Ejido Dolores, R.96	-33.4799	-58.232517
11004	3663	Soriano, Ejido Dolores, R.96	-33.656151	-58.15151
11005	8131	Soriano, Camino Concordia	-33.554572	-58.423062
11006	3665	Soriano, R.96 Km 25	-33.565532	-58.201248
11007	8132	Soriano, Cañada Nieto, R.96	-33.700506	-58.112285
11008	3667	Soriano, Cañada Nieto	-33.700506	-58.112285
11009	8133	Soriano, Colonia Agraciada, R.21 Km 283	-33.835016	-58.371048
11010	8134	Soriano, Colonia la Uruguaya, R.21 Km 281	-33.883731	-58.375921
11011	8135	Soriano, Cañada Magallanes	-33.4833	-58.1677
11012	8136	Soriano, Palmitas	-33.498495	-57.814887
11013	3672	Soriano, Palmitas Colonia Collazo	-33.498495	-57.814887
11014	8138	Soriano, Colonia T. Collazo	-33.498495	-57.814887
11015	8139	Soriano, El Águila, R.3 Km 148	-33.600651	-57.976477
11016	8140	Soriano, R.2 Km 222	-33.611116	-57.647195
11017	3676	Soriano, Pueblo Risso	-33.624965	-57.575269
12001	8141	Colonia, Carmelo Colonia Estrella	-33.958204	-58.307005
12002	8142	Colonia, Polanco, R.12 Km 14	-33.961368	-58.182135
12003	8143	Colonia, Cno. Víboras Carmelo	-34.015593	-58.230645
12004	8144	Colonia, Cuchillas, R.21 Km 225	-34.117338	-58.005402
12005	8145	Colonia, Cuchillas, R.21 Km 223	-34.128138	-57.979652
12006	8146	Colonia, Paso Antolín, R.22 Km 178	-34.198155	-57.785865
12007	8147	Colonia, Rosario, R.2	-34.293633	-57.340479
13001	3110	San José, R.1 Km 31	-34.75323	-56.422147
13002	3111	San José, Colonia Wilson, R.1 Km 32	-34.736615	-56.449483
13003	3112	San José, Parador Gino, R.1 Km 34.5	-34.737798	-56.446644
13004	3113	San José, Colonia Wilson, R.1 Km 35	-34.701472	-56.512638

Cont. Table S1

Identification numbers for the accessions		Location and estimated coordinates		
URZM	URGY	Department, place, route and kilometre	Latitud (dec)	Longitud (dec)
13006	8098	San José, Colonia Wilson, R.1 Km 36	-34.711783	-56.489308
13005	3114	San José, Colonia Wilson, R.1 Km 37	-34.701472	-56.512638
13007	3116	San José, Colonia Wilson, R.1 Km 39,5	-34.69648	-56.522598
13008	3117	San José, Colonia Wilson, R.1 km 39.5	-34.69648	-56.522598
13009	3118	San José, Colonia Wilson, R.1 Km 40	-34.69648	-56.522598
13010	3119	San José, Libertad, R.1 Km 47	-34.667613	-56.570835
13011	8099	San José, Libertad, R.1 Km 47	-34.667613	-56.570835
13012	3121	San José, Colonia Wilson, R.1 Km 35	-34.70575	-56.50442
13013	3122	San José, Libertad, R.1 Km 45.5	-34.700554	-56.497889
13014	3123	San José, Libertad, R.1 Km 46.8	-34.661761	-56.590147
13015	3124	San José, Libertad, R.1 Km 46.8	-34.65753	-56.590555
13016	3125	San José, Libertad, R.1 km 48.2	-34.653404	-56.57857
13017	3126	San José, Puntas de Valdez, R.1 Km 58.5	-34.592057	-56.698873
13018	3127	San José, Puntas de Valdez, R.1 Km 66	-34.559154	-56.746273
13019	3128	San José, Puntas de Valdez, R.1 Km 61	-34.597065	-56.679783
13020	8100	San José, Puntas de Valdez, R.1 Km 66	-34.559154	-56.746273
13021	3130	San José, Puntas de Valdez, R.1 Km 65	-34.570887	-56.726961
13022	3131	San José, Puntas de Valdez, R.1 Km 56.5	-34.595294	-56.69941
13023	3132	San José, Puntas de Valdez, R.1 Km 65	-34.56856	-56.72591
13024	8101	San José, R.1 Km 82	-34.449468	-56.905415
13025	3134	San José, Ecilda Paullier, R.1 Km 89	-34.426443	-56.948147
13026	8102	San José, Ecilda Paullier, R.1 Km 97.5	-34.407591	-56.984764
13027	8103	San José, R.1 Km 87.5	-34.41656	-56.962722
13028	8104	San José, Puntas de Valdez, R.1 Km 77	-34.490258	-56.840256
13029	3141	San José, Paso del Bote	-34.578406	-56.499424
13030	3148	San José, R.3 Km 79	-34.353721	-56.724286
16001	8113	Lavalleja, R.13 Km 187.5	-34.19637	-54.835793
16002	8114	Lavalleja, R.8 Km 100	-34.429468	-55.437294
18001	8115	Tacuarembó, Lambaré	-31.529115	-55.955499
18002	8116	Tacuarembó, Rincón de Neves	-31.330766	-55.968034
18003	8117	Tacuarembó, Zapará, R.31	-31.679569	-56.059157
18004	8118	Tacuarembó, Batoví	-31.88519	-56.010519
18005	8119	Tacuarembó, Batoví	-31.88519	-56.010519
18006	8120	Tacuarembó, Batoví	-31.88519	-56.010519
18007	8123	Tacuarembó, R.44, 3 Km desde Ansina	-31.87906	-55.461785

Supplemental material S2

Identification code numbers of seven original accessions, and the corresponding regenerations at INIA La Estanzuela (Uruguay) and CIMMYT (Mexico).

Original	Regenerated in Uruguay	Regenerated in Mexico
URZM 13004	URGY 3113	Reg10
URZM 13005	URGY 3114	Reg12
URZM 13007	URGY 3116	Reg17
URZM 11004	URGY 3663	Reg1055
URZM 11006	URGY 3665	Reg1068
URZM 12001	URGY 8141	Reg1116
URZM 12006	URGY 8146	Reg1152

Supplemental material S3

SSR markers adjusted for the studied maize populations with PCR programme and annealing temperature, and polymorphic information content (PIC) for the analysis of diversity and structure of the Uruguayan White Dent collection.

SSR marker	Repeat	Chromosome and bin	Fluorochrome	PCR Program	Annealing temperature			PIC
					X °C	Y °C	Z °C	
phi308707	AGC	1	FAM	Standard	54			
phi056	CCG	1.01	HEX	Standard	56			0.806
phi227562	ACC	1.12	HEX	Standard	56			0.882
phi090	ATATC	2.08	HEX	Touchdown		66	60	0.082
phi96100	ACCT	2.00	HEX	Touchdown		60	54	0.750
nc133	GTGTC	2.05	HEX	Standard	54			0.024
phi083	AGCT	2.04	FAM	Standard	54			0.560
phi127	AGAC	2.08	HEX	Standard	62			0.432

Cont. Table S3

SSR marker	Repeat	Chromosome and bin	Fluorochrome	PCR Program	Annealing temperature			PIC
					X °C	Y °C	Z °C	
phi046	ACGC	3	HEX	Touchdown		66	60	
phi102228	AAGC	3.04	HEX	Standard	54			0.450
phi076	AGCGGG	4.11	FAM	Standard	60			
phi072	AAAC	4.01	FAM	Standard	56			0.259
phi093	AGCT	4.08	FAM	Touchdown		64	58	0.527
phi079	AGATG	4	FAM	Standard	62			
phi085	AACGC	5.07	HEX	Touchdown		66	60	0.670
umc 1332	CTA	5.04	HEX	Standard	60			0.696
phi109188	AAAG	5.03	FAM	Standard	54			0.575
nc130	AGC	5	HEX	Standard	54			
phi299852	AGC	6.08	FAM	Touchdown		66	60	0.710
phi031	GTAC	6.04	FAM	Standard	60			0.527
phi123	AAAG	6	HEX	Standard	54			
umc 1545	AAGA	7	FAM	Touchdown		66	60	0.417
phi069	GAC	7	HEX	Touchdown		64	58	
umc 1066	CCT	7.01						
phi057	GCC	7.01	FAM	Standard	62			0.644
phi034	CCT	7.02	HEX	Touchdown		66	60	0.638
phi115	AT/ATAC	8.03	HEX	Standard	54			0.396
umc 1161	GCTGGG	8.06	FAM	Standard	54			0.553
umc 1304	TCGA	8.02	FAM	Standard	54			0.324
phi108411	AGCT	9	FAM	Touchdown		66	60	0.406
phi065	CACTT	9	HEX	Standard	54			0.578
umc 1367	CGA	10.03	HEX	Touchdown		66	60	
phi062	ACG	10.04	HEX	Standard	56			0.637
phi059	ACC	10.02	HEX	Touchdown		64	58	0.807
phi084	GAA	10.04	FAM	Standard	54			0.561

Supplemental material S4

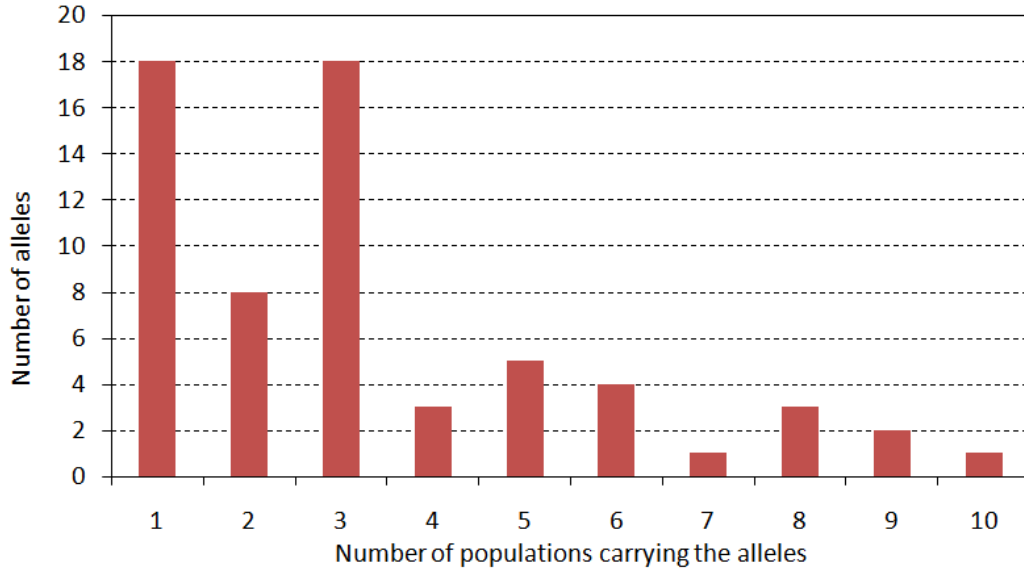


Figure S4a. Distribution of the 63 alleles present as a maximum in ten different accessions. The first column represents the number of private alleles, present in only one accession. The majority of these alleles (44/63) were present only in three or less accessions.

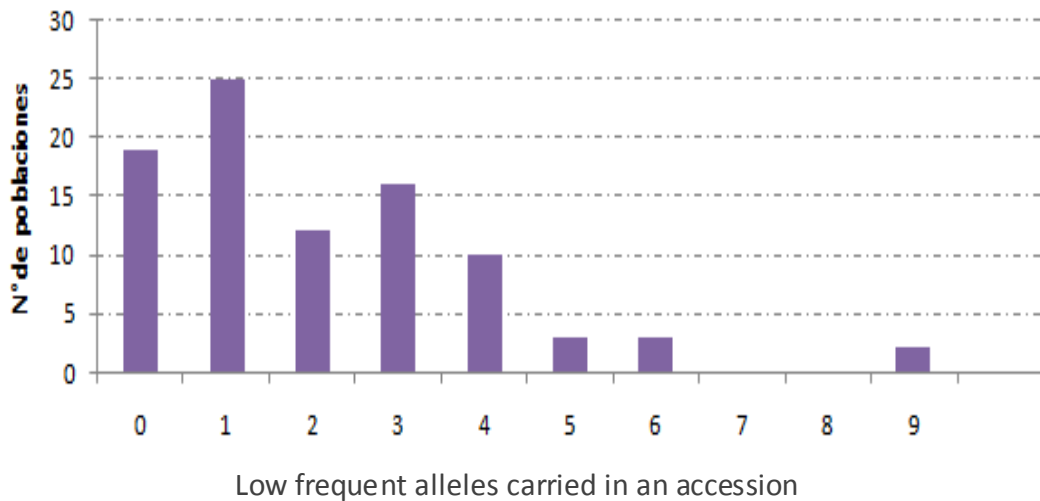


Figure S4b. Distribution of the 90 accessions in function of the number of alleles carried from the group of 63 alleles.

Supplemental material S5

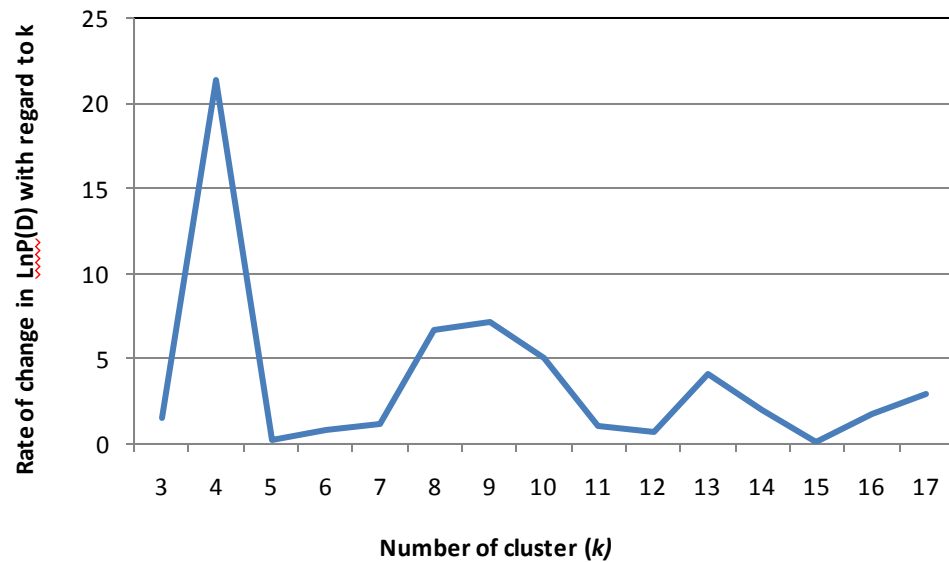


Figure S5. Optimal number of clusters (k) determined by simulating k from 1 to 17 in Structure v. 2.3.4 and plotting k (x -axis) versus Evano's Δk : absolute value of the second order rate of change of the likelihood distribution of $\text{LnP}(D)$ or $\text{Pr}(X/k)$ values provided by Structure v. 2.3.4, in function of k (Evano et al. 2005)

Supplemental material S6

Exact test of Fisher between the original and regenerated populations, for the distribution of allele frequencies of each SSR marker.

SSR	Original 11006		Original 12001		Original 12006		Original 13005		Original 13007		Original 13004		Original 11004	
	mx1068-1	3665-1	mx1116-1	8141-1	mx1152-1	8146-1	mx12-1	3114-1	mx17-1	3116-1	mx10-1	3113-1	mx1055-1	3663-1
phi102228	0,67333	1,3E-05 *	0,19451	2,8E-09 *	0,00317 *	0,62664	0,43891	6,2E-07 *	0,4295	0,7891	0,1039	0,0645	0,26684	1,9E-07 *
phi108411	1	6,9E-10 *	0,00131 *	1,5E-13 *	0,00546 *	0,03522	0,53209	1,1E-09 *	1	0,7480	1	0,1798	0,57681	7,8E-13 *
phi065	2,5E-05 *	1,2E-07 *	0,02044	0,01065	0,24112	0,00038 *	0,00442 *	1,9E-08 *	0,3377	0,0963	0,0455	0,2703	0,01530	8,6E-09 *
umc1161	0,02108	0,01440	5,81E-08 *	0,04731	0,00031 *	0,03034	0,00199 *	2,5E-05 *	0,0182	0,0040 *	0,6119	0,0270	1	0,3334
phi 227562	3,9E-10 *	3,5E-08 *	1,23E-05 *	2,8E-10 *	1,06E-12 *	3,3E-06 *	1,4E-09 *	4,3E-18 *	7,7E-08 *	9,6E-05 *	8,6E-18 *	5,6E-10 *	1,2E-07 *	4,5E-05 *
phi127	1	0,36036	0,00386 *	0,06198	0,58738	1	0,78917	0,3074	0,5959	0,0692	1	0,7961	0,27891	1
phi062	2,3E-07 *	0,00015 *	0,80324	0,06601	0,10955	0,35633	1,8E-05 *	0,0016 *	0,2511	0,0388	9,2E-07 *	0,3060	0,22079	1,9E-06 *
phi109188	8,1E-05 *	2,0E-08 *	0,00177 *	0,04838	1,22E-05 *	0,00658 *	0,00787 *	1,4E-09 *	0,0184	0,3963	8,6E-05 *	0,1299	0,19963	0,0106
phi056	3,1E-06 *	4,2E-05 *	1,15E-05 *	0,00178 *	0,22448	0,00456 *	0,01244	1,5E-06 *	0,1207	4,5E-08 *	0,0387	0,4327	0,21064	0,0014 *
phi059	0,57323	6,9E-05 *	0,16621	0,01615	0,00331 *	8,5E-05 *	0,00016 *	0,0002 *	0,0161	0,0144	0,5001	1,8E-06 *	0,02407	3,1E-05 *
phi034	0,65611	0,02843	0,57837	0,18557	0,31560	0,22444	0,28750	6,7E-05 *	0,1737	0,9690	0,0626	0,0012 *	0,40776	1
umc1545	0,00584 *	0,92062	0,03034	0,05747	0,01218	0,02374	0,08202	0,0295	0,0521	0,4238	0,0175	0,4238	0,02053	0,4868

(*) denotes significant differences between original and regenerated populations ($\alpha = 0.01$).

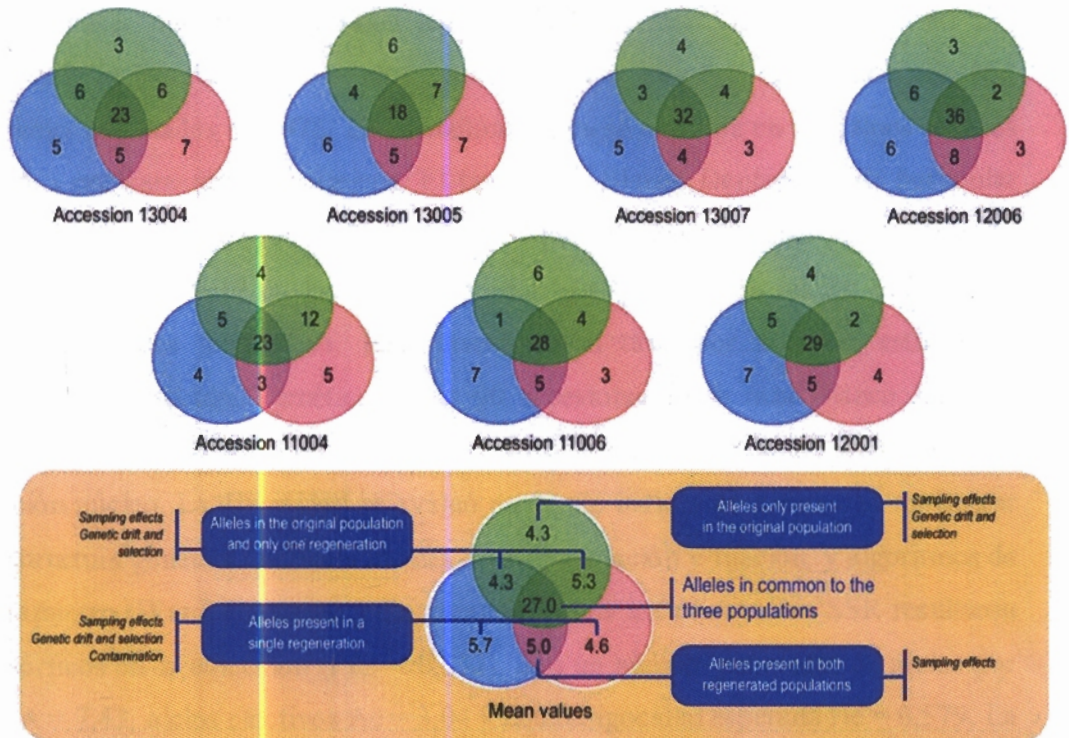


Fig 7 The number of alleles from 12 simple sequence repeat (SSR) markers shared by the original accessions (green circle on top) and the corresponding regenerations in Mexico (red, bottom right) and in Uruguay (blue, bottom left), shared by two of the three populations, and unique alleles for the original population, Mexico or Uruguay, with lists of the putative causes under each situation.

2.5 DISCUSSION

Landraces are defined as distinct populations that evolved under the influence of geographical or ecological conditions, such as climate, soil and crop management (Cömertpay et al. 2011). Landraces are diverse in their genetic composition between populations as well as within populations (Brown 1978; Angioi et al. 2011). In allogamous species the majority of the diversity is found within accessions or populations, and to a less extent between them (Hamrik and Godt 1996; Monteverde